

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN EINFLUSS DER UV-STRAHLUNG
AUF DEN GEHALT AN FREIEN AMINOSÄUREN
IN DER MENSCHLICHEN HORNSCHICHT

Peter Fries

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE

BALNEOLOGIE UND KLIMATOLOGIE

DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. med. H. Drexel

Untersuchung über den Einfluß der UV-Strahlung

auf den Gehalt an freien Aminosäuren in der
menschlichen Hornschicht

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Fries

aus

München

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Dr.H.PRATZEL
Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.DREXEL
Dekan: Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 30.5.1978



Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Die Haut	3
1. Anatomie und Histologie	3
2. Der Stoffwechsel der Haut	6
3. Der Verhornungsprozeß	8
4. Chemische Zusammensetzung der Hornhaut	11
Bestandteile der Hornschicht	
Das Wasserlösliche	
Lösliche Proteine	
5. Photochemie	14
Physikalische Grundlagen	
Allgemeine Reaktionsmechanismen	
Spezielle Reaktionen der Proteine	
und Aminosäuren	
6. Funktion der Haut	20
III. Versuchsbeschreibung	22
1. Materialgewinnung	22
Versuchspersonen	
Bestrahlungsquelle und Bestrahlungsmodus	
Abrißtechnik	
2. Materialverarbeitung	25
Aufbereitung der Proben	
Chromatographie	
3. Auswertung der Chromatogramme	26

4. Urocaninsäurebestimmung	27
5. Harnstoffbestimmung	28
IV. Ergebnisse	29
1. Identifizierung der Aminosäuren	29
2. Bestimmung der Mittelwerte des molaren Gehalts	30
Darstellung der Mittelwerte des molaren Gehalts	32
	-41
V. Diskussion	42
Versuchsansatz	
Versuchsdurchführung	
Pigmentierung der Haut	
Fehlermöglichkeiten	
Ergebnisse	
VI. Zusammenfassung	55
VII. Literaturverzeichnis	57

I. Einleitung

"Beim Menschen bildet die Epidermis eine lebende Mauer, die schmiegsam und doch widerstandsfähig die gesamte Körperoberfläche überzieht". (Braun Falco 1967)

Als Grenze zur Umwelt muß sie sich den unterschiedlichen Beanspruchungen durch Änderungen ihrer Morphologie, ihrer Biochemie und ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften funktionell anpassen.

Die Haut ist exogenen Einflüssen, wie Änderungen der Temperatur, der Luftfeuchtigkeit, Wasser, mechanischen und chemischen Reizen und nicht zuletzt der Strahlung ausgesetzt. (19)

Dabei stehen die Wirkungen des Ultraviolettlichtes gegenüber denen des sichtbaren oder gar des infraroten Lichtes im Vordergrund. Schon lange sind die Pigmentierung der Haut, der Sonnenbrand und die aktinische Hyperkeratose (Lichtschwiele) als Effekte des ultravioletten Lichtes bekannt. Auch degenerative Prozesse der Haut, wie aktinische Elastose und Keratose werden auf chronische UV-Exposition zurückgeführt. Die aktinische Keratose ihrerseits stellt eine Präkanzerose dar, auf deren Boden sich bevorzugt spinözelluläre Karzinome entwickeln. Basaliome entstehen zwar meist auf klinisch normal aussehender Haut, sind aber in sonnenreichen Gegenden wie in Australien und im Süden der USA trotzdem häufiger als in lichtarmen. Im Wissen um diese Zusammenhänge ist der, besonders in der Werbung für sogenannte Solarien hervorgehobenen, "allgemein gesundheits-

fördernden Wirkung der UV-Strahlung" mit Zurückhaltung zu begegnen.

Auf der anderen Seite wird die UV-Strahlung für therapeutische Zwecke genutzt. So hat sich die Behandlung von Tuberkulose, Rachitis, Psoriasis vulgaris, Neurodermitis diffusa, Akne, Furukulose, um nur die wichtigsten zu nennen, in empirisch erschlossenen Fällen bewährt. (4)

Auch der rein kosmetischen Bräunung in "Solarien" kommt eine steigende Bedeutung zu.

Dieser Ausblick läßt ahnen, wie vielfältig die Einflüsse des UV-Lichtes auf den Stoffwechsel der Haut sein müssen. Dabei kommt dem Stoffwechsel der Proteine und ihrer Bausteine, der Aminosäuren, eine besondere Bedeutung zu. Die Aminosäuren vermögen auf UV-Bestrahlung mit einer Vielzahl von Reaktionen zu antworten, welche im Kapitel "Photochemie der Haut" dargestellt werden.

Ich habe mir die Aufgabe gestellt, die Veränderungen der relativen Konzentrationen der freien Aminosäuren in der Hornschicht menschlicher Epidermis durch UV-Strahlung zu untersuchen. Die freien Aminosäuren ermöglichen, als entscheidender Bestandteil des Wasserlöslichen der Hornschicht, einen Einblick in den Proteinstoffwechsel der Epidermis und sind mit der Säulenchromatographie gut bestimmbar.

Zum Verständnis der Arbeit ist es notwendig, über den anatomischen und biochemischen Aufbau der Epidermis, über ihren Stoffwechsel und ihre Funktion zu referieren.

II. Die Haut

1. Anatomie und Histologie (14)

Die Haut ist ein beim Erwachsenen ca. $1,6 \text{ m}^2$ großes Organ, das bei Lupenvergrößerung Schichtenbauweise zeigt.

Die Oberhaut (Epidermis) besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel und ist ektodermaler Herkunft. Die mesodermale Lederhaut (Corium) ist bindegewebig und wird in ein Stratum reticulare, eine besonders derbe Faserschicht, die der Festigkeit dient, und in ein Stratum papillare, das zapfenförmig mit dem Epithel verzahnt ist, unterteilt.

Epidermis und Corium werden als Cutis zusammengefaßt und der Subcutis (Unterhautfett und Bindegewebe) gegenübergestellt. Das Frischgewicht der Epidermis beträgt rund 0,5 kg, das des Corium ca. 3,5 kg und die gesamte Haut einschließlich der Subcutis wiegt sogar 18 - 20 kg.

Die Epidermis besitzt selbst keine Gefäße. Sie muß durch Diffusion vom Corium aus versorgt werden. Das Corium erhält seine Gefäße aus dem ausgedehnten Gefäßnetz zwischen Cutis und Subcutis.

Der größte Teil der Haut zeigt eine rhombische Felderung, sog. Felderhaut. In Hohlhand und Fußsohle dagegen besitzt die Haut Leisten, sog. Leistenhaut, deren Muster genetisch festgelegt ist. Je nach Lokalisation erreicht die Epidermis eine Höhe von 0,04 bis 0,23 mm; an Schwielen sogar bis zu 2 mm. Der Anteil der Hornschicht ist, je nach mechanischer Inanspruchnahme, großen Schwankungen unterworfen.

Der Verhornungsprozeß, bei dem in ca. 30 Tagen aus einer Basalzelle eine an der Oberfläche liegende Hornschuppe geworden ist, führt innerhalb der Epidermis zu einer differenzierten Schichtenbildung. So kann man histologisch ein Stratum basale, das aus hohen, zylindrischen Zellen besteht, ein Stratum spinosum (Stachelzellschicht, polyedrische Form), ein Stratum granulosum (Körnerschicht) und ein Stratum corneum (Hornschicht) unterscheiden. In der Leistenhaut kommt zwischen Str. granulosum und Str. corneum noch ein Stratum lucidum vor. Hier durchtränkt das stark lichtbrechende Eleidin die Zellen, sodaß eine optisch homogene, helle Schicht entsteht.

Stratum basale, spinosum und granulosum werden als Stratum germinativum (Keimschicht) zusammengefaßt. Die Zellen des Str. germinativum besitzen intrazelluläre Tonofibrillen, die die Festigkeit erhöhen. Sie verlaufen innerhalb der Zelle zwischen den Desmosomen, überqueren aber nicht den Interzellulärspalt. Die Tonofibrillen verlaufen insgesamt so, daß sie gemeinsame, durch alle Schichten hindurchziehende trajektorielle Bügel bilden, deren Scheitel gegen die Oberfläche gerichtet sind. Im Str. spinosum sind die zwischenzelligen Spalten erweitert, die Desmosomen entsprechend verlängert; sie nehmen "Stachelform" an.

Im Str. granulosum entstehen basophile Keratohyalin granula und sog. Keratinosomen als Vorstufen der Hornsubstanz.

Im Str. corneum sind die Zellen abgeplattet, Zellkern und Mitochondrien sind zugrunde gegangen. Die Zellen des Str.

corneum enthalten ferner Fetteinschlüsse.

In seiner lockeren, oberflächlichen Lage spricht man von der Pars disjuncta, während der innere Anteil, der mit der übrigen Haut fest verbunden ist, als Pars conjuncta bezeichnet wird. Die Hornzellen sind hier durch Desmosomen fest miteinander verankert. Die Pars conjuncta entspricht als lückenlos zusammenhängende, frisch verhornte Grenzschicht dem "Barrierehäutchen". In der Pars disjuncta verlieren die Desmosomen und die Kittsubstanz ihre Wirkung und die säulenartig angeordneten Hornzellen lösen sich in immer kleiner werdende Inselchen auf. An der Auflösung der Desmosomen und der Kittsubstanz sind Bakterien maßgeblich beteiligt. Bakterien lassen sich in gesunder Epidermis nur in der Pars disjuncta nachweisen. (3)

Als zweite Zellart kommen neben den verhornenden Epithelzellen, im Verband der Epidermis, die Melanozyten vor. Sie wandern während der Fetalentwicklung aus der Neuralleiste in die Haut ein, wo sie sich weiter vermehren. Sie liegen zwischen den Zellen des Str. basale und haben einen großen, zentralen Zellkern; sie besitzen aber weder Tonofibrillen noch Desmosomen.

Die Melanozyten übertragen sog. Melanosomen (vom Golgiapparat abstammende ca. $0,7\mu$ x $0,3\mu$ große Bläschen, die das braunschwarze Pigment Melanin speichern) in die Zellen des Str. germinativum. Je nach Körperregion kommt auf 4 - 13 Basalzellen ein Melanozyt. Rassenunterschiede in der Hautfarbe beruhen nicht auf der Zahl der Melanozyten, sondern auf Unterschieden in Zahl und Verteilung der Melanosomen.

Das Corium, das mit dem Papillarkörper über eine Basalmembran unmittelbar an die Epidermis grenzt, ist ebenfalls individuell und lokal verschieden stark ausgeprägt. Höhe und Anzahl der Papillen hängen von der mechanischen Beanspruchung ab; sie sind z.B. in der Kopfhaut gering, über Knie und Ellenbogen stark entwickelt.

Das lockere Bindegewebe des Papillarkörpers führt Kapillarschlingen, arteriovenöse Verbindungen, Nerven und, besonders reichlich in den Fingerbeeren, Meissnersche Tastkörperchen. Das Str. reticulare, eine aus durchflochtenen Bündeln kollagener Fasern aufgebaute Schicht, ist arm an Zellen und Grundsubstanz. Auf das Str. reticulare geht die Zerreißfestigkeit der Haut zurück. Die Subcutis wird nicht mehr zur Haut gezählt, gehört aber funktionell zu ihr, da sie die Verbindung mit den tiefer gelegenen Geweben (Faszie, Muskulatur) herstellt und die Hautbeweglichkeit über diesen bestimmt. Das teils als Baufett (Fußsohle), teils als Depotfett (Bauch) fungierende Fett ist durch Bindegewebssepten in Läppchen unterteilt.

2. Der Stoffwechsel der Haut

Da die Epidermis nicht vaskularisiert ist, muß sie durch Diffusion vom Corium aus versorgt werden, was von entscheidender Bedeutung für ihren Stoffwechsel ist.

"Entsprechend dem zur Oberfläche hin progressiven Schwund der Mitochondrien kommen die strukturgebundenen Enzymsysteme (Citratcyclus, Atmungskette) zum Erliegen. Extramitochondriale

Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatcyclus reichern sich dagegen im Zuge der Zelltransformation an." (10)

Ferreira-Marques nennt das Str. basale und spinosum auch Str. oxybioticum und stellt ihm den Begriff Str. anoxybioticum für Str. granulosum und corneum gegenüber. (8)

Die Proteinbiosynthese in der Epidermis erfolgt an den Ribosomen über aktivierte Aminosäuren. Sie ist durch den genetischen Code determiniert.

"Autoradiographische Untersuchungen mit Aminosäuretracern haben zwei Zentren der Proteinsynthese in der Epidermis ergeben: das erste in den basalen Zellagen (Anreicherung von Methionin, Leucin, Phenylalanin), in der sog. Regenerationszone, und das zweite in den oberen, kernhaltigen Zellschichten, insbesondere im Str. granulosum. In den letzteren, unmittelbar vor der Verhornung und damit vor dem Zelltod stehenden Zellschichten ist lange Zeit eine Synthese ab ovo für unmöglich gehalten worden. In dieser Region kann aber nunmehr die Synthese von mindestens drei Proteinen als erwiesen gelten: eines Histidin-, eines Glycin- und eines Cystein-Proteins, welche für die Keratinisierung von Bedeutung sind." (21)

Die Proteolyse geschieht mit Hilfe proteolytischer Enzyme. Wie auch sonst im Körper finden sich in der Haut zwei Gruppen: Endopeptidasen, welche innere Peptidbindungen spalten und Exopeptidasen, welche nur endständige Aminosäuren abspalten. Es handelt sich einmal um hautspezifische Proteasen (Kathepsine), zum anderen um Enzyme, die unter bestimmten

Verhältnissen auf dem Blutwege der Haut zugeführt werden. (10)

3. Der Verhornungsprozeß

"Während seiner etwa 1 Monat langen normalen Lebensdauer vollbringt der einzelne Keratinocyt eine Reihe von strukturellen und biochemischen Änderungen und verwandelt sich aus einem kubischen, kernhaltigen Protoplasmaklumpchen in eine harte, kernlose Schuppe, die zwar biologisch tot ist, aber das funktionelle Endprodukt darstellt, das die Integrität des Körpers gewährleistet". (18)

Für jede abgeschilferte Hornschuppe muß sich nur eine von je 25 Basalzellen, die unter ihr stehen, teilen. Die Erneuerungszeit der Epidermis, von der Basalzellschicht bis zum Eintritt der Keratinozyten in die Hornschicht, variiert, je nach Lokalisation zwischen 6 (Kopf) und 14 (Rumpf) Tagen; bis zur Abschilferung der Hornschuppen vergeht bei Orthokeratose noch einmal dieselbe Zeit. (6)

Unspezifische Reize mechanischer, chemischer oder physikalischer Art steigern die Zellneubildung. Die Epidermisproliferation wird durch Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30.000 - 40.000, welche die Bezeichnung Chalone haben, reguliert. Dieser Stoff wird bei geschlossener Epithelisierung der Haut ständig in der Epidermis gebildet und diffundiert zu den teilungsfähigen Basalzellen. Unter der Mitwirkung von Adrenalin und Hydrocortison als Co-faktoren begrenzt Chalone die Teilung der Basalzellen und hindert die obersten Zellagen auch an der Keratini-

sierung. Wird das geschlossene Epithel durch exogene (Verletzung, UV) oder endogene Einflüsse unterbrochen, so wird auch die Chalonebildung vermindert. Als Folge des Wegfalls der Hemmung steigt die Zellteilungsgeschwindigkeit. Das gedankliche Konzept hierzu stammt von Bullough.(5)

Die Differenzierung von der Basalzelle zur Hornschuppe ist durch einen allmählichen Verlust der Mitochondrien, des Golgiapparates und schließlich des Zellkerns gekennzeichnet.

Als neue Strukturen treten Granula, die mit Keratohyalin gefüllt sind und Keratinosomen auf. Über die Herkunft des Keratohyalins wie der Keratinosomen herrscht noch keine Einigkeit.

Keratohyalin scheint für den Zusammenhalt der Keratinfilamente in der endgültigen Keratinstruktur verantwortlich zu sein, während die Keratinosomen eine "Mittlerrolle zwischen Fettstoffwechsel und Verhornung der Epidermis zu spielen scheinen." (17)

Auffällig sind das Fehlen von Schwefelgruppen und ein relativ hoher Histidin-Gehalt der Keratohyalin granula.

Nach Untersuchungen von Schwarz (21) kann ein sog. Histidinprotein bei der Biogenese von Keratohyalin als essentieller Partner angesehen werden. Es fehlt - wie auch die als Proteinmolekülkoppler fungierende Urocaninsäure - bei Verhornungsstörungen, beispielsweise bei Psoriasis, wenn die Bildung von Keratohyalin ausbleibt. Morphologisch sichtbar erfolgt die Verhornung fast von einer Zelllage zur andern.

Die Keratohyalingranula werden wieder aufgelöst, der Kern in weder histologisch, noch chemisch einwandfrei nachweisbare Trümmer zerlegt und die gesamte Zelle stark dehydriert. Der pH-Wert fällt dabei von ca. 7 auf Werte von 4-5. Die Hornschicht stellt mit 10 % Wassergehalt die wasserärmste Struktur des Körpers dar. Es handelt sich dabei aber nicht um einen Austrocknungseffekt (der Föt im Fruchtwasser zeigt auch Verhornung), sondern um einen vom Epithel gesteuerten Vorgang. (26)

"Die Verhornung der Epidermis ist ebensowenig ein Degenerationsvorgang, wie die Bildung der kernlosen (und daher biologisch toten) Erythrozyten aus der Stammzelle im Knochenmark. Keratinisierung ist ein komplizierter synthetischer Prozeß." (18)

Über die Entstehung des Hornschichtskleroproteins bestehen unterschiedliche Anschauungen. Stüttgen (29) spricht von Cystineinlagerungen in vorgeformte Tonofibrillen, während Debersaques und Rothman (7) nachgewiesen haben wollen, daß das Keratin aus freien Aminosäuren und kleimolekularen Bestandteilen völlig de novo gebildet wird. Aufgrund der heutigen Vorstellung über die biologische Proteinsynthese wird angenommen, daß zuerst lösliche Proteine an den Ribosomen der Epidermiszellen entstehen, die als Vorstufen des Keratins anzusehen sind.

Das Endprodukt des Verhornungsvorganges, das Keratin, ist als fibrilläres Protein der Hauptbestandteil der Hornschicht. Es kann in das relativ harte, widerstandsfähige und schwer

lösliche Skleroprotein B und in das relativ leicht lösliche Skleroprotein A unterteilt werden. Durch Strukturanalysen mittels der Röntgendiffraktion konnte für das Str. corneum die gleiche Grundstruktur wie für Haare und Nägel, nämlich die α -Helix festgestellt werden. (1)

"Zwei oder drei dieser Helices sind zu einem "Seil" verdreht. Elf solcher Seile bilden eine Protofibrille, wobei zwei Seile in der Mitte und neun außen herum liegen." (11) Die größere Zugfestigkeit und Hitzestabilität von Haaren und Nägeln kann durch den höheren Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren erklärt werden. (1) Auch ist der Orientierungsgrad der Filamente unterschiedlich. (bei Haaren sehr groß - bei Str. corneum weniger ausgeprägt.)

4. Chemische Zusammensetzung der Hornhaut

Nach Szakall (31) besteht die Hornschicht zu 50 % aus Skleroproteinen, zu 38 % aus wasserlöslichen Verbindungen, zu 10 % aus Wasser und zu 2 % aus Lipiden (Durchschnittswerte für die Barriere)

Scheinbar widersprüchlich dazu geben Spier und Pascher (27) für das Oberflächenschäbzel folgende Werte an: Skleroprotein 50 %, Wasserlösliches 23 %, Lipide 20 %, Wasser 7 %. Der höhere Gehalt an Lipiden ist auf Talgbeimengungen zurückzuführen. Auf fettfreies Trockengewicht bezogen, ergeben sich nämlich für die Barriere 42 % und für das Oberflächenschäbzel 35 % Wasserlösliches.

Auf den stofflichen Aufbau des Skleroproteins wurde schon im

vorausgegangenen Kapitel eingegangen.

Das Wasserlösliche (WL) ist überwiegend epidermaler Herkunft, während die sudorigenen und sebogenen Komponenten eine untergeordnete Rolle spielen. (9)

Schwarz versteht unter dem WL die "Summe von kleinmolekularen, organischen Verbindungen, die bei der epidermalen Verhornung aus dem Abbau von Zellbestandteilen anfallen, soweit diese bzw. ihre Bausteine nicht bei der Bildung der verhornten Strukturen wieder verwendet werden." (22)

Das WL der Hornschicht setzt sich zu 40 % aus freien Aminosäuren, 9 % Pyroglutaminsäure, 2,3 % Urocaninsäure, 10 % Lactat, 5 % Harnstoff, Citrat, Ammoniak, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Phosphat und Chlorid zusammen. (28)

Erst in den letzten Jahren finden lösliche Proteine als Bestandteile der Epidermis und der Hornschicht Beachtung. Bei normaler Verhornung machen sie 1 - 2 % des Gewichtes der Hornschicht bezogen auf Trockengewicht aus. (12) Da die Epidermis ca. 3 mal soviel lösliche Proteine enthält, folgert Schwarz (22), daß diese unter normalen Bedingungen größtenteils zu unlöslichen Skleroproteinen transformiert, oder zu wasserlöslichen Substanzen hydrolisiert werden.

Bei einer Verhornungsanomalie wie der Psoriasis findet man eine Verminderung der kleinmolekularen organischen Substanzen im WL. Sie wird auf mangelnde Hydrolyse von Zellbestandteilen bei Eintritt in die Verhornungszone zurückgeführt. (23)

Dementsprechend ist hier auch der Gehalt an löslichen Proteinen in der Hornschicht signifikant erhöht. (In Psoriasis-

schuppen 5,5 - 16 Massenprozent bezogen auf Trockengewicht) Folge ist das Fehlen von wesentlichen Bausteinen zur Neusynthese verhornungsspezifischen (großmolekulären) Materials, sodaß diese Prozesse beeinträchtigt sind. (23)

Es finden aber auch Verschiebungen im Verhältnis der Aminosäuren untereinander statt. So steht Serin im WL normaler Hornschicht mit einem Anteil von 25 % der freien Aminosäuren mengenmäßig an erster Stelle. Serin, Glycin und Citrulin machen sogar etwa die Hälfte aus.

Bei Psoriasis dagegen ist Serin auf 1/10, Serin, Glycin und Citrulin auf 1/5 vermindert. (24)

Die Bildung der Urocaninsäure ist mit der besonderen Rolle von keratohyalinständigem Histidin verknüpft. Bei Versuchen von Schwarz (25) zeigte sich nach intradermaler H_3 -Histidin Injektion, daß die in vitro bewiesene Conversion zu Urocaninsäure auch in vivo stattfindet. In parakeratotischen Psoriasissschuppen fehlt die Urocaninsäure und die Keratohyalinbildung ist nur mangelhaft ausgeprägt.

Die schon früher erwähnten löslichen Proteine konnten von Leonhardi (13) mit Hilfe der Disc-elektrophorese aufgetrennt und durch spezifische Färbungen identifiziert werden. Im Präalbuminbereich normaler Epidermis reagierten 4 Banden nucleinsäure positiv. Ihr Anteil an den gesamten löslichen Proteinen beträgt ca. 2 - 10 %. Im Präalbuminbereich von normaler Hornschicht allein, reagierte dagegen nur 1 Bande nucleinsäurepositiv; und in den zugehörigen Seren konnten nucleinsäurepositive Präalbumine nie beobachtet werden.

In einem bestimmten Bereich hinter dem Albumin fehlen in normaler Hornschicht Nucleoproteine, während in Psoriasis-schuppen zwei starke, beschbarte Nucleoproteinbanden auftreten, die ca. 25 % der gesamten löslichen Proteine ausmachen.

Mit immunoelektrophoretischen Methoden gelang der Nachweis von Albumin und γ -Globulin in Epidermis- und Hornschicht-extrakten. Von dem gleichen Untersucher konnte bei der Auftrennung von nicht verhornenden Epithelien (Zungenschleimhaut) vor dem Albumin nur 1 Nucleoproteinbande beobachtet werden, die der am schnellsten wandernden Bande in Epidermis-extrakten entspricht. Diese Bande wird auch in den Proteinspektren anderer Gewebsextrakte (Leber, Leukocyten, Erythrozyten) beobachtet.

Das regelmäßige Auftreten von 4 Nucleoproteinen vor dem Albumin scheint auf Epidermisextrakte beschränkt zu sein; 3 davon sind epidermisspezifisch. Da sie in Extrakten nicht verhornender Epithelien fehlen, liegt eine Verknüpfung mit dem Verhornungsprozeß nahe.

5. Photochemie

Die nachfolgenden Ausführungen stützen sich auf das von Ippen verfaßte Kapitel "Photochemie der Haut", aus dem Buch "Biochemie der Haut". (10)

Unter Licht versteht man im physikalischen Sinne elektromagnetische Wellen von 1mm bis 1nm Länge. Das für den Menschen sichtbare Licht liegt zwischen 360 nm und 800 nm Wellenlänge.

Der an das kurzwellige Violett angrenzende Bezirk heißt Ultraviolett (UV), und wird in das Vakuum UV (1-200 nm) und das eigentliche UV-Licht mit den Bereichen C (200-280nm), B (280-315nm) und A (oberhalb 315nm) unterteilt. Diese Einteilung beruht überwiegend auf physiologischen Tatsachen, berechtigt aber nicht zur Annahme fundamentaler Unterschiede zwischen den verschiedenen Bereichen und berücksichtigt auch nicht die praktisch bedeutsame Grenze der Ozonabsorption bei 290-295nm, die die untere Wellenlängengrenze des Sonnenlichts auf der Erdoberfläche bedingt.

Für das Verständnis photochemischer Reaktionen ist es notwendig sich das Licht als Energieklümpchen, sprich Quant vorzustellen. Nach Planck gilt für die Quantenenergie folgende Beziehung: Quantenenergie = $h \cdot \frac{c}{\lambda}$. Da sich also Quantenenergie und Wellenlänge umgekehrt proportional verhalten, folgt, daß bei gleicher Quantenzahl die Strahlung umso energiereicher ist, je kürzer ihre Wellenlänge ist. Das heißt, die biologischen Effekte einer Strahlung sind umso größer, je kürzerwellig diese ist. Wie schon in der Einleitung angesprochen, stehen die Wirkungen des UV-Lichts gegenüber denen des Sichtbaren im Vordergrund.

Beim Auftreffen von Lichtquanten auf die Haut können diese entweder unverändert abprallen (Reflexion), unverändert passieren (Transmission), oder zurückgehalten werden, indem ihre Energie von bestimmten Molekülen aufgenommen wird (Absorption). Nur das letztgenannte Phänomen führt nach dem Gesetz von Grotthus und Draper (1818) zu photochemischen Re-

aktionen.

Ein zweites Fundamentalgesetz der Photochemie, das Reziprozitätsgesetz von Bunsen und Roscoe besagt, daß für den Umsatz bei einer photochemischen Reaktion nur das Produkt aus Lichtintensität und Belichtungszeit (c.t) maßgeblich ist.

Von entscheidender Bedeutung für die Wirkungen ist die Eindringtiefe des Lichts. Für das photobiologisch besonders interessante kurzwellige UV-Licht, muß man eine starke Intensitätsabnahme in der Hornschicht und in den oberen Lagen der Epidermis annehmen. In der basalen, mitoseaktiven Epidermislage werden nur noch Werte unter 1 % der Oberflächenintensität erreicht. Diese Wellen sind bei der Intensität des Sonnenlichts meßtechnisch praktisch verschwunden; was aber nicht heißt, daß dieses 1 % photobiologisch unwirksam ist.

Der Großteil der UV-Strahlung wird also in der oberflächlichen Epidermis absorbiert.

Die Folgen dieser Quantenabsorption lassen sich in 2 Gruppen unterteilen.

Die eine Gruppe zeichnet sich dadurch aus, daß das absorbierende Molekül am Ende der Reaktion wieder unverändert vorliegt. (photoelektrischer Effekt, Photolumineszenz) Bei der anderen Gruppe verbleibt die absorbierte Energie in den Reaktionsprodukten, das heißt, energiereichere Verbindungen entstehen (Photolyse, Photoisomerisation, Photosynthese, Photodimerisation bzw. Photopolymerisation).

Unter lichtinduzierten Reaktionen versteht man solche, bei denen durch einen photochemischen Primärprozeß eine Kette von Reaktionen mit gleichartigen Endprodukten ausgelöst wird. Primärreaktionen dauern sehr kurz (10^{-10} sec.) und führen in der Regel zu lichtunabhängigen Sekundärreaktionen.

Ein Sonderfall ist die Photosensibilisierung. Sie hat Ähnlichkeit mit der Katalyse, da der Sensibilisator über den durch das Lichtquant bewirkten angeregten Zustand, nach Abgabe der Energie in den Grundzustand zurückkehrt. Durch Photosensibilisierung können an sich lichtunabhängige Reaktionen indirekt durch Licht ausgelöst werden. Als Konsequenz ergibt sich der Vorbehalt: Eine in vitro noch so eindeutig lichtbedingte Reaktion darf auf Gewebe erst dann als Primärreaktion übertragen werden, wenn andere Möglichkeiten, vor allem Photosensibilisierungen vorher ausgeschlossen wurden.

Allgemeine photochemische Grundvorgänge in Zellen und Geweben sind das Auftreten oder Verschwinden von Sulfhydrylgruppen (SH-) und Disulfidgruppen (S-S), auf das bei der Lichtreaktion der Aminosäuren noch zurückzukommen ist. Sie sind zweifellos nicht nur für das photochemische Verhalten der schwefelhaltigen Aminosäuren oder des Keratins bedeutsam, sondern spielen bei den lichtbedingten Veränderungen aller Eiweißkörper einschließlich der Enzyme, der Proteohormone und der Nucleoproteide eine Rolle.

Noch universeller ist die Bedeutung freier Radikale, die wegen ihrer großen Reaktionsfähigkeit eine die verschiedensten Zell-

strukturen gefährdende Noxe darstellen.

Bei photochemischen Reaktionen von Proteinen sind die Aminosäuren als Bausteine derselben der Angriffspunkt für die energiereichen Strahlen. Durch ihre Reaktionen kann es zu Änderungen der Primär-, Sekundär, Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins kommen.

Die Untersuchung der photochemischen Veränderungen von Aminosäuren in vitro stellt einen der ältesten Zweige der photobiologischen Grundlagenforschung dar.

Allgemeine Reaktionsmechanismen sind die Desaminierung zu α -Hydroxycarbonsäuren und die Decarboxylierung zum Amin. Andere Reaktionen sind die Spaltung von Amiden durch Licht an der $-\text{CO}-\text{NH}_2$ -Bindung, sodaß die entsprechenden Aminosäuren entstehen. So können einfachere Aminosäuren wie z.B. Glycin, Alanin oder Asparaginsäure photochemisch aus höheren durch Decarboxylierung, Desaminierung und Transaminierung gebildet werden.

Die Untersuchungen an schwefelhaltigen Aminosäuren wurden mit Wellenlängen durchgeführt, die für die Reaktionen der Haut im Sonnenlicht bedeutungslos sind (besonders 254nm). Ob eine der nachfolgenden Reaktionen in menschlicher Haut bei Einwirkung von Sonnenlicht als Primärreaktion abläuft ist ungewiß.

Cystin kann in Cystein gespalten und umgekehrt Cystein zu Cystin synthetisiert werden. Auch die Umwandlung von Cystein in Alanin unter H_2S Abspaltung ist bekannt.

Johns und Jaskewycz haben 1965 bei der Photolyse des Histidins durch UV-Licht von überwiegend 336nm folgende Produkte er-

halten: Histamin, Urocaninsäure, Citrullin, Hydroxyprolin, Harnstoff, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin, Serin, Glycin, α - und β -Alanin, Oxal-, Glyoxyl- und Kohlensäure. Seit ihrem ersten Nachweis in der menschlichen Haut und der Feststellung ihrer Lichtschutzwirkung spielt die Urocaninsäure in den Untersuchungen zur Lichtphysiologie und -pathologie der Haut eine bedeutende Rolle. Sie kommt in vergleichsweise großer Menge in Hornschichtextrakten vor. Ihr photochemisches Verhalten ist einerseits durch ihre lichtinduzierte Bildung aus Histidin als trans-Form, andererseits durch ihre photochemische Umwandlung in die cis-Form und ihre schließliche photochemische Zersetzung gekennzeichnet. Neuere Untersuchungen sprechen für eine Histidaseaktivierung (Zenisch), die Histidin enzymatisch zu UCS desaminiert. Ein Beweis für die zentrale Stellung der UCS in den photochemischen Reaktionen der Haut steht noch aus, da zum einen mit unphysiologischen Wellenlängen gearbeitet wurde und zum anderen die UCS-Absorptionsmaxima weit unterhalb der untersten Wellenlänge des Sonnenlichts liegen. Es bleibt abzuwarten, ob die sicher vorhandene Lichtschutzwirkung nicht eher photochemisch als physikalisch absorptiv erklärt werden kann. Neben den S-haltigen spielen die aromatischen Aminosäuren deshalb eine besondere Rolle, weil sie im Vergleich zu den aliphatischen AS langwelligere Absorptionsmaxima besitzen und dadurch deutlich lichtempfindlicher sind. In Proteinen stellen diese AS die Punkte dar, an denen die Lichtwirkung bevorzugt eintritt. Als besonders lichtempfindlich erweisen sich Tyrosin

und Tryptophan, die ebenso wie Phenylalanin beim Belichten melaninartige Produkte liefern können. Die durch das aromatische Ringsystem absorbierte Energie führt entweder zur Spaltung des Rings, beziehungsweise zur Oxidation zu phenolischen -OH Gruppen, oder sie wird als innermolekulare Photosensibilisierung auf benachbarte Gruppierungen übertragen.

6. Die Funktion der Haut

An erster Stelle steht die Schutzfunktion der Haut. Sie schützt den Körper vor mechanischen, chemischen, thermischen, strahlenbedingten Schäden und vor dem Eindringen vieler Krankheitserreger.

Von entscheidender Bedeutung für die Schutzfunktionen ist die Hornschicht. Sie hemmt die Permeation von außen und steuert zugleich die Abgabe von Substanzen aus dem Körperinneren. Mit Entfernung der Hornschicht ist die Permeation auf ein mehrfaches gesteigert (Keratinolytica); damit verbunden ist eine Wasserdampfabgabe, die etwa der einer freien Wasseroberfläche entspricht. (30)

Der schwach saure pH-Wert der Hautoberfläche und das Vorhandensein bakterizider Stoffe wie Fettsäuren, saure AS und Milchsäure hemmen das Wachstum vieler Bakterien und Pilze. (15)

Für den sauren pH-Wert der Hautoberfläche sind die freien AS im WL mitverantwortlich. Ein nicht kompensierbarer Verlust des WL wird von Pratzel (20) als Ursache für trockene und rissige Haut angesehen. Das WL hat demnach einen wesentlichen Anteil

an der Wasserbindungsfähigkeit der Hornschicht.

Die Schutzfunktion gegen schädigende Strahlen wird einerseits durch Dickenzunahme der Hornschicht ("Lichtschwiele"), andererseits durch UV absorbierende Inhaltsstoffe des WL, vor allem UCS, bedingt. So ist es verständlich, daß nach einem ausgiebigen Baden bzw. Schwimmen mit teilweiser Ausschwemmung des WL, eine erhöhte Sonnenbrandgefahr besteht. Als Organ der Temperaturregulation steuert die Haut die Wärmeabgabe des Körpers durch Erweiterung oder Verengung der Blutgefäße ihres Bindegewebes und durch Flüssigkeitsabgabe der Schweißdrüsen. Die isolierende Wirkung des Unterhautfettes unterstützt dabei die Konstanterhaltung der Körperinnentemperatur.

Die Haut ist durch die vielen, in Corium und Subcutis liegenden Rezeptoren, für Druck, Temperatur und Schmerzreize nicht nur ein vielseitiges Sinnesorgan, sondern ganz allgemein der wichtigste Vermittler der verschiedensten Umweltreize.

Um die Einflüsse der UV-Strahlung auf den Proteinstoffwechsel der Epidermis kennenzulernen, untersuchte ich die freien AS in der Hornschicht. Die HS ist als Produkt des epidermalen Stoffwechsels und durch die Möglichkeit ihrer schmerzlosen Ablösung, als Untersuchungsmaterial besonders geeignet. An einer Gruppe von 18 Versuchspersonen sollten die Unterschiede der relativen Konzentrationen der freien AS in der HS, zwischen einer nicht gebräunten und einer maximal gebräunten Hautstelle,

geprüft werden.

3. Versuchsbeschreibung

1. Materialgewinnung

Für die Versuche standen mir 15 Frauen und 3 Männer zur Verfügung. 10 Frauen waren von Beruf Krankenschwesternschülerinnen, 2 Krankenschwestern, 2 Chemotechnikerinnen und 1e Sekretärin.

Von den 3 Männern waren 2 Krankenpflegeschüler und 1er Geologe. 16 Personen waren zwischen 18 und 25 Jahren alt, 1e 54 und 1er 32. Eine besondere Auswahl nach exogen wie endogen den AS-Gehalt der Hornschicht beeinflussenden Faktoren wie Ernährung, Badegewohnheiten, Neigung zum Schwitzen, Haut- und Haarfarbe konnte nicht getroffen werden. Die einzigen Gemeinsamkeiten waren das Alter und die Jahreszeit, in der die Versuche stattfanden. Hauptbestrahlungsmonat war April, in einigen Fällen auch noch Mai.

Alle Versuchspersonen befanden sich in einem guten bis sehr guten Allgemeinzustand und waren hautgesund.

Als Bestrahlungsquelle diente das "Solarium de Luxe" der Firma Hanau, das 3 UV-Strahler aus Spezialquarz und 2 Infrarot-hellstrahler enthält. Das Spektrum der UV-Strahler setzt sich sowohl aus Linien im UV-B wie im UV-A Bereich zusammen, wobei gegenüber gewöhnlichen Höhensonnen der Anteil des UV-A im Solarium relativ und absolut größer ist. Mit diesem Solarium führte ich bei allen Versuchspersonen Ganzkörperbestrahlungen

durch, womit ich den Wünschen meiner Versuchspersonen entsprach.

Anfangs wurde nach Anleitung der Fa. Hanau bestrahlt, das heißt: Abstand des Strahlers vom Körper 2m bzw. 1,20m und dem Bestrahlungstag entsprechende Bestrahlungszeiten. (Abstand 2m, 1., 2., 3.,12. Bestrahlungstag und zugehörige Bestrahlungszeit in Minuten 3,3,4,5,7,9,11,14,18,23, 30 bzw. Abstand 1,20m und 2,2,3,3,4,5,6,7,8,10,12,15 Minuten Bestrahlungsdauer)

Es zeigte sich jedoch bald, daß die für die vorgeschriebenen Bestrahlungsabstände angegebenen Bestrahlungszeiten in keinem Fall ausreichten um eine Bräunung zu erreichen. Da das gewünschte und versprochene Ziel eine Vollbräunung war, entschloß ich mich nach durchschnittlich 8 vorschriftsmäßigen Bestrahlungen zu einer Verkleinerung des Bestrahlungsabstandes auf 80 cm. Auch die Bestrahlungszeiten erhöhte ich nach eigenem Ermessen (bis 40 min.). In einigen Fällen wurde täglich bestrahlt und nicht wie vorgeschlagen nur jeden zweiten Tag. Eine Bestrahlungsbehandlung umfaßte insgesamt 10 bis 20 Bestrahlungstage.

Trotz der wesentlichen Änderungen im Bestrahlungsmodus konnte auch jetzt in vielen Fällen nur eine mittelstarke, in einigen wenigen Fällen sogar nur eine schwache Bräunung erreicht werden, die nicht die im Sommer erworbene Bräunungsintensität erreichte, wie die Versuchspersonen enttäuscht versicherten. Eine sogenannte Direktpigmentierung (sofort beobachtbare Dunke-

lung durch Oxidation vorhandener Pigmentvorstufen) konnte in keinem Fall beobachtet werden. Erst nach Dosissteigerungen für die entsprechenden Bestrahlungstage wurden die Erythemschwellen erreicht und eine "Sekundärpigmentierung" (Melaninneubildung als Folgeprozeß des UV-Erythems) folgte. Nach einem stärkeren Erythem wurde meist drei Tage pausiert. Als Abrißstelle wählte ich das Gesäß, welches mir deshalb gut geeignet schien, weil es am wenigsten exogenen Einflüssen, besonders Sonnenstrahlung und Wasser, ausgesetzt ist.

Um Vergleichen zu können, wurde eine Gesäßhälfte mit Alufolie abgedeckt und damit vor den UV-Strahlen sicher geschützt.

Ungefähr eine Woche nach Bestrahlungsende wurde, mit Tesafilm^R der Fa. Beiersdorf, nach der von Wolf 1935 eingeführten Strippingmethode das Str. corneum disjunctum abgerißen. Dazu mußte, auf die vorher mit 15cm abgemessene und markierte Hautstelle ein ca. 20cm langer Tesafilmstreifen von 12mm Breite aufgeklebt werden und mit den, durch Gummihandschuhe geschützten Fingern gleichmäßig festgestrichen werden. Anschließend wurde wechselseitig abgerißen, um eine gleichmäßige Abtragung der Hornschicht zu erreichen. Die so abgeriessene Hornschichtfläche betrug 18cm².

Zum Entfernen des Str. corneum disjunctum waren zwischen 7 und 14 Abriße nötig. Das Erreichen der Barriere erkennt man am Auftreten glänzender Areale. Die angegebenen Abrißzahlen beziehen sich auf die unbestrahlten Stellen, während damit auf

der bestrahlten Seite die Barriere meist noch nicht erreicht war.

2. Materialverarbeitung

Die Weiterverarbeitung erfolgte direkt anschließend an den Abriß. Dazu wurden die 15 cm langen Streifen in ca. 1cm lange Schnipsel zerschnitten und einzeln in Zentrifugengläser jongliert, die mit 5ml einer 0,1 normalen Salzsäurelösung gefüllt waren. Jeder Schnipsel mußte sofort mit Flüssigkeit benetzt werden, um ein Aneinanderkleben zu vermeiden und damit eine optimale Elution zu erreichen. In jedem Glas befanden sich, je nach Anzahl der Abriße, zwischen 100 und 200 Schnipsel. Um Berührungen mit den Fingern zu vermeiden wurde nur mit Pinzetten gearbeitet. Anschließend wurden die Zentrifugengläser mit Parafilm^R verschlossen und eine Stunde lang in einem Schüttelapparat bewegt. Nach dem Hochziehen der aneinanderhaftenden Schnipsel über den Flüssigkeitsspiegel und dem Abtropfen des restlichen Eluats, wurde dieses in kleine Plastikhütchen (Eppendorf) abgefüllt und bei -18°C tiefgefroren. Die schnelle Verarbeitung von maximal 3 Stunden soll einem Zerfall der Aminosäuren vorbeugen.

Nachdem alle 36 Abriße in dieser Art verarbeitet waren, begann ich mit der säulenchromatographischen Auftrennung der Aminosäuren und colorimetrischer Messung der Ninhydrinreaktion, was vollautomatisch mit dem Aminosäure-Autoanalyzer T S M 1^R der Firma Technicon geschah. Das Verfahren arbeitet

nach einem 5 1/2 Stunden-Zwei-Säulensystem mit Lithium-Puffern und mißt die Extinktion bei 440 und 570 nm. Als Kationenaustauscher dient Polystyrolsulfonat.

3. Auswertung der Chromatogramme

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte von Hand, nachdem sich die Übertragung der Kolorimetersignale auf Lochstreifen im 10 Sekundenrhythmus als zu ungenaue Information für die rechnerische Konzentrationsbestimmung mittels EDV-Rechenanlage erwies; für schmale, steile Peaks waren die Signale nicht ausreichend dicht.

Mit Hilfe von durchsichtigen Schablonen wurde die Höhe der Aminosäurepeaks bestimmt. Mit einer Lupe mit eingebauter Meßskala konnte die Halbwertsbreite auf 1/10mm genau bestimmt werden. Das Produkt aus Peakhöhe mal Halbwertsbreite ergibt ein Maß für die Peakfläche.

Um von diesen Flächen auf Mengen umrechnen zu können sind Chromatogramme von Testgemischen mit bekanntem AS-Gehalt notwendig. Zu diesem Zweck wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende der Serie Testgemische von 20 μ l Probenvolumen und einer Konzentration von 2,5 μ Mol/ml für alle AS aufgetragen, deren Flächen als Eichdaten dienten. Die eingesetzte Menge betrug so 50nmol für jede AS des Testgemisches. Teilt man diese Menge durch die jeweiligen Aminosäureflächen aus den Testgemischen, so erhält man Faktoren, mit denen man die Flächen der Probe für die entsprechenden Aminosäuren

multiplizieren muß, um die Mengen zu erhalten, die von jeder einzelnen AS in der Probe sind.

Durch die Mittelung der Werte aus 3 Testgemischen werden Unterschiede in der Empfindlichkeit des Chromatographen berücksichtigt.

Da die Proben aus 200 µl Eluat bestehen, uns aber die Menge in nmol/cm² der Hautfläche interessiert, muß noch mit 25 multipliziert werden und durch 18 geteilt werden, da wir ja 18 cm² abgerißene Hornschichtfläche in 5 ml eluiert haben. Für die Berechnung der Konzentrationen in nmol/cm² Hautoberfläche ergibt sich die Gleichung:

$$\frac{50 \cdot F_P \text{ AS} \cdot 5 \cdot 5}{F_{\text{mAS}} \cdot 18} = \text{Konzentration (nmol/cm}^2 \text{ Hautoberfläche)}$$

F_{mAS} = mittlere Fläche der Aminosäure aus den Testgemischen

F_{P AS} = Fläche der entsprechenden Aminosäure aus der Probe

Diese Gleichung gilt sowohl für die Berechnung der Konzentrationen aus dem bei 570nm messenden Kanal, wie für den bei 440nm messenden. Dieser war notwendig, wenn die Höhe des Peaks im "570nm Kanal" über die Papierbreite hinausging.

Kleine und sehr flache Peaks sind besser mit einem Planimeter auszumessen gewesen.

4. Urocaninsäurebestimmung

Die UCS kann durch ihre UV-Absorption bei 268nm in einem Photometer gemessen werden.

Als erstes mußte ein UCS-Standard hergestellt werden und mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eine Eichkurve angefertigt

werden.

Dazu wurden mit einer Analysenwaage 5,29 mg abgewogen und in 100ml Aqua bidestillatum gelöst. Da das Molekulargewicht der UCS 156,14 beträgt, gelten die folgenden Beziehungen:

$$156,14g \text{ in } 1000ml \hat{=} 1 \text{ mol/l}$$

$$5,29mg \text{ in } 100ml \hat{=} 338,82 \mu\text{mol/l}$$

In die Küvette werden jeweils 2ml einer 0,1 normalen Salzsäure und 100 μ l Probe bzw. Standard pipettiert und die zugehörige Extinktion nach Umrühren mit einem Einmalplastikspatel abgelesen.

Aus der Extinktion läßt sich die Konzentration der Probe in nmol/cm² nach der hier hergeleiteten Gleichung berechnen.

$$\begin{aligned} \text{Konzentration Probe} &= \frac{E_{Pr} \cdot \text{KonzStd} \cdot 5}{E_{Std} \cdot 18} \\ &= \frac{E_{Pr} \cdot 338,82 \cdot 5}{0,39 \cdot 18} \end{aligned}$$

$$(\text{gemessen: } E_{Std} = 0,39) \quad = E_{Pr} \cdot 241,3076$$

$$(\text{errechnet: KonzStd} = 338,82\text{nmol/ml})$$

5. Harnstoffbestimmung

Die Harnstoffbestimmung wurde mit einer Biochemica-Test-Kombination der Fa. Boehringer durchgeführt.

Sie enthält Urease, Harnstoff, Phenol und Hypochlorit.

Prinzip: Harnstoff wird in der durch Urease katalysierten enzymatischen Reaktion unter Bildung von Ammoniumcarbonat gespalten. Die entstandenen Ammoniumionen reagieren mit Phenol und Hypochlorit unter Bildung eines blauen Farbstoffs,

dessen Farbintensität der Harnstoffkonzentration proportional ist und bei 546 nm gemessen wird.

Die Standardlösung von Harnstoff liegt in einer Konzentration von 0,5 mMol/l vor.

Da wir unverdünntes Eluat in die Probe einsetzen, ergibt sich für die Berechnung der Konzentration folgende Gleichung:

$$c = 0,5 \frac{E_{Pr}}{E_{Std}} \text{ mMol/l}$$

und nach Umrechnung in nMol/cm²:

$$c = 0,5 \frac{E_{Pr} \cdot 5}{E_{Std} \cdot 18} \text{ nMol/cm}^2$$

IV. Ergebnisse

1. Identifizierung der Aminosäuren

In den Testgemischen waren die folgenden 19 Aminosäuren und Ammoniak enthalten, die in den Chromatogrammen in der Reihenfolge Asparaginsäure (Asp), Threonin (Thr), Serin (Ser), Glutaminsäure (Glu), Glutamin (Gln), Glycin (Gly), Alanin (Ala), Citrullin (Cit), Valin (Val), Cystin (Cys), Methionin (Met), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Ammoniak, Ornithin (Orn), Lysin (Lys), Histidin (His), Arginin (Arg) erschienen.

In den Hauteluaten konnten neben 22 Aminosäuren noch Ammoniak und zwischen Histidin und Arginin ein Aminpeak identifiziert werden. Ein, nach dem Leucin ziemlich regelmäßig erscheinender Peak, konnte nicht identifiziert werden und wurde deshalb

mit XXX bezeichnet. Zusätzlich wurden Harnstoff und Urocaninsäure in den Hornschichteluates nachgewiesen und bestimmt.

In den Chromatogrammen der Proben erschienen die Aminosäuren in der Reihenfolge: Asp, Thr, Ser, Asn, Glu, Gln, Pro, Gly, Ala, Cit, ABS, Val, Met, Ile, Leu, XXX, Tyr, Phe, Trp, Ammoniak, Orn, Lys, His, Amin, Arg.

2. Bestimmung der Mittelwerte des molaren Gehalts

Aus den Peakflächen der Chromatogramme, bzw. den daraus errechneten Konzentrationen der Aminosäuren in nmol/cm^2 und den entsprechenden Werten für Harnstoff und UCA wurden die Differenzen zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Stellen aus je 18 Proben bestimmt. Außer bei Arginin und der nicht identifizierten Substanz, war bei allen anderen Substanzen eine signifikante Mengenzunahme pro Quadratzentimeter der bestrahlten Hautstelle mit dem T-Test nach Student nachzuweisen, die insgesamt 71 % ausmachten. (Summe der molaren Konzentrationen der bestrahlten Stelle: Summe der molaren Konz. der unbestrahlten Stelle = 1,71). Diese Zunahme erklärt sich wohl in erster Linie durch eine größere Menge an abgeriebenem Hornschichtmaterial auf der bestrahlten Seite, was man auf die durch UV-Licht hervorgerufene Hyperkeratose zurückführen kann. Schon makroskopisch beobachtete ich, beim Abreißen an der bestrahlten Hautstelle, eine stärkere Haftung der Hornsubstanz am Tesafilmstreifen als an der unbestrahlten Hautstelle.

Da die Hornschichtmasse nicht bekannt war, (wegen der Tesa-

filmstreifen) schied das Vergleichen von absoluten Werten aus.

Die folgende Tabelle gibt die mittleren molaren Konzentrationen (nmol/cm^2) der freien AS, des Harnstoffs, der UCS und des Ammoniaks für die bestrahlte und die unbestrahlte Hautstelle wieder.

Die P-Werte geben die Irrtumswahrscheinlichkeit aus dem T-Test nach Student an.

Mittlere molare Konzentrationen pro Flächeneinheit(nmol/cm²)

	bestrahlt	unbestrahlt	P-Wert
Harnstoff	32,91	21,61	0,053
UCS	71,67	33,22	0,000
Asp	74,47	37,38	0,001
Thr	84,15	51,22	0,004
Ser	382,47	222,47	0,007
Asn	25,64	9,62	0,061
Glu	33,32	24,76	0,126
Gln	3,12	1,95	0,161
Pro	33,14	16,02	0,000
Gly	213,32	116,52	0,001
Ala	129,30	77,46	0,004
Cit	94,92	68,03	0,027
ABS	1,27	0,50	0,002
Val	45,62	22,62	0,000
Met	6,15	1,90	0,000
Ile	27,06	13,09	0,000
Leu	31,42	12,18	0,000
XXX	2,55	3,74	0,049
Tyr	27,17	15,29	0,001
Phe	17,73	7,40	0,000
Trp	7,44	3,27	0,003
Ammoniak	74,02	44,37	0,000
Orn	65,34	27,12	0,001
Lys	32,84	14,23	0,000
His	63,18	59,66	0,711
Amin	6,35	2,37	0,000
Arg	20,84	29,63	0,162

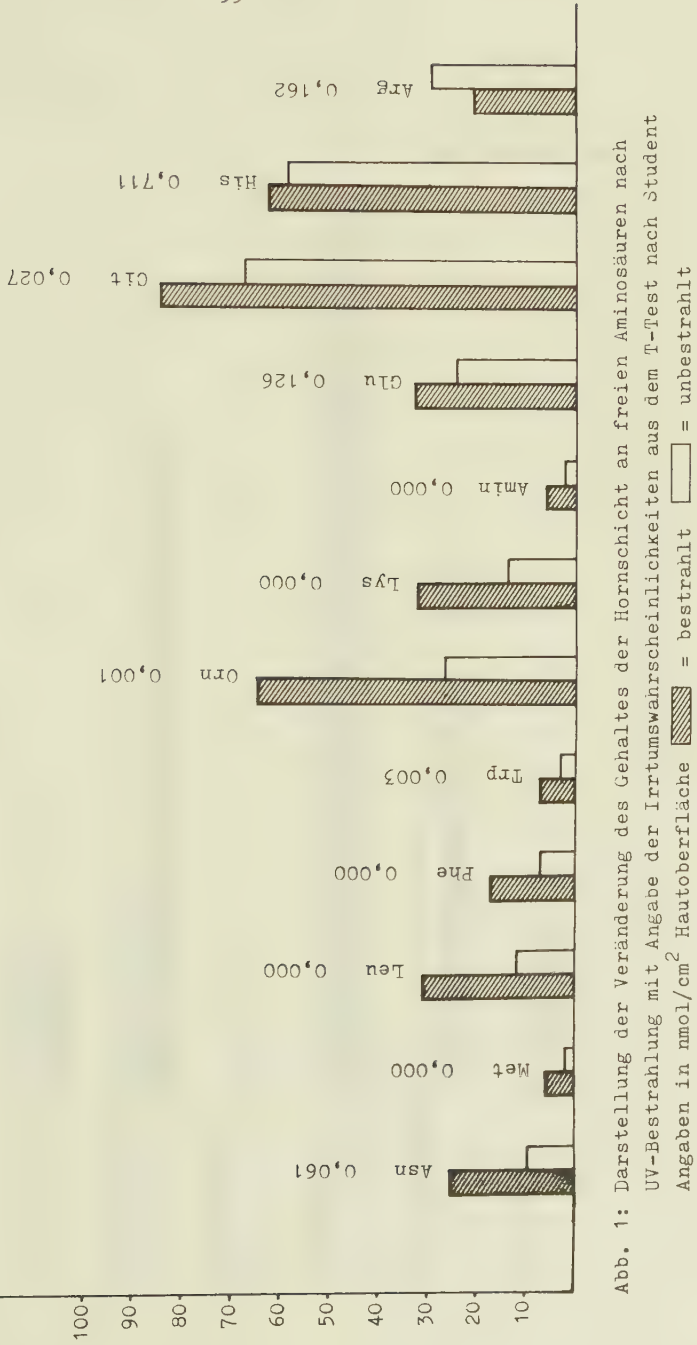
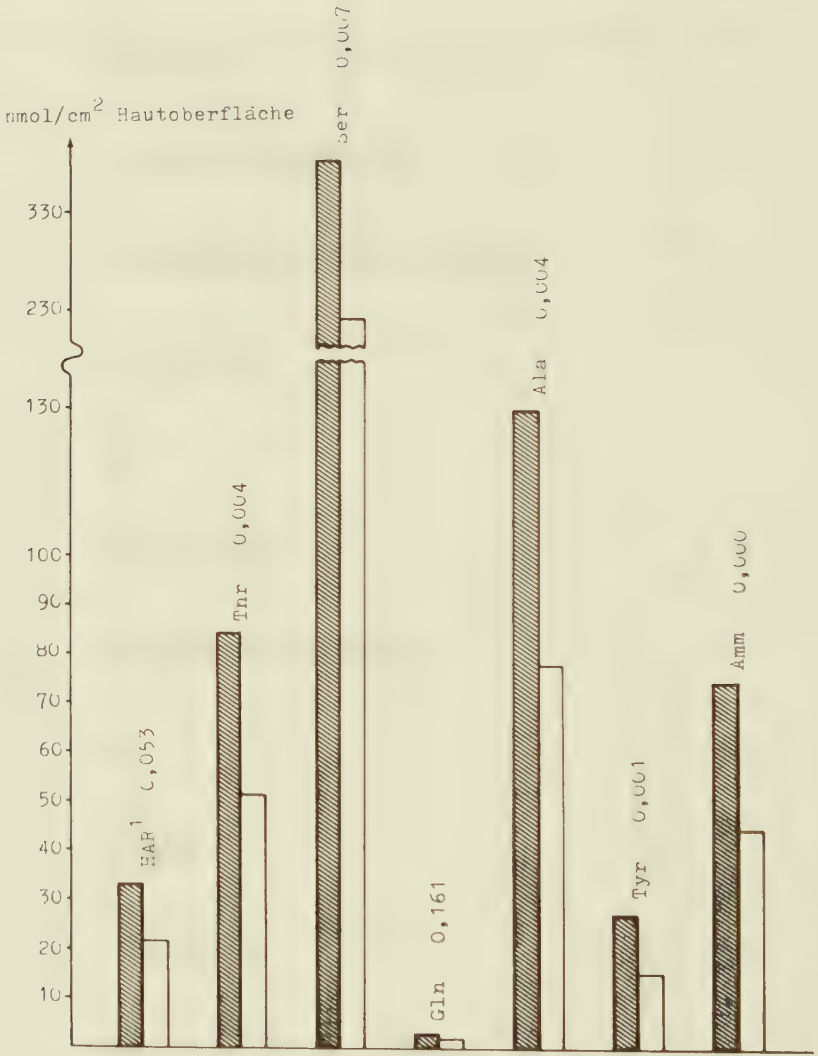


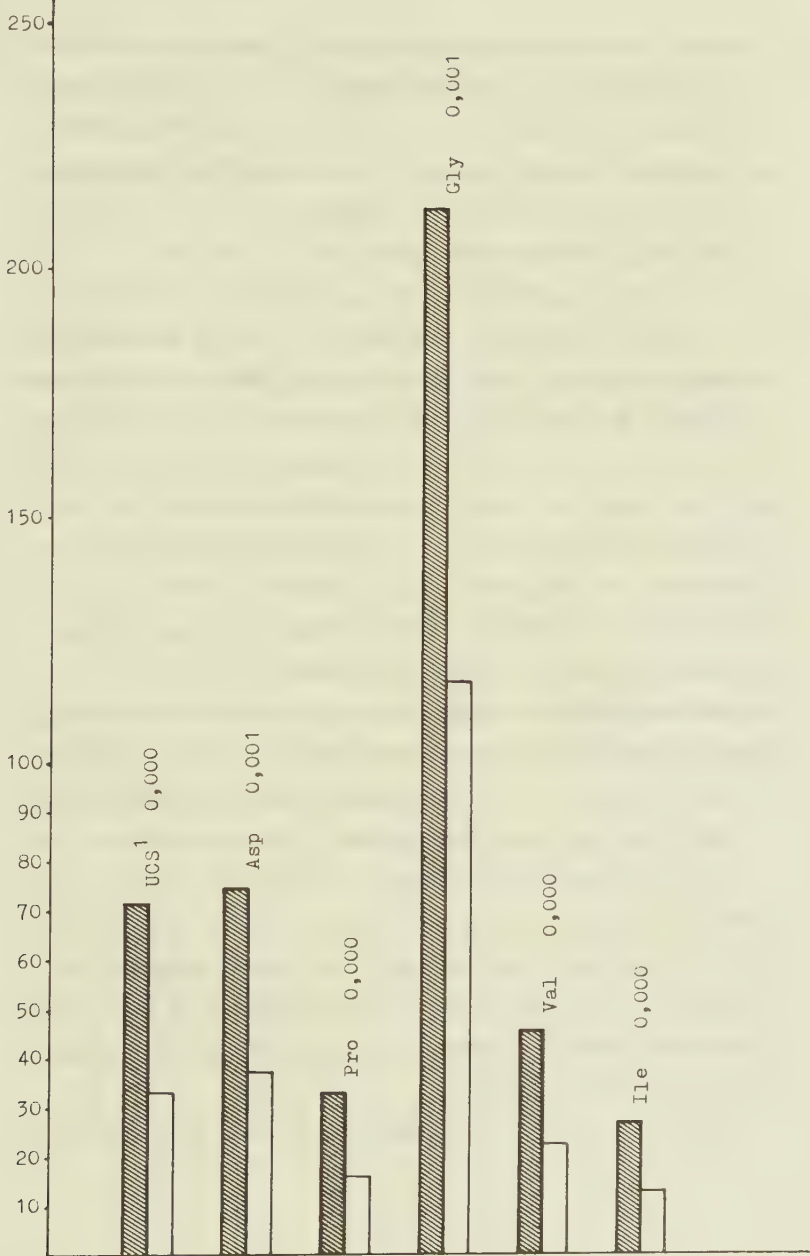
Abb. 1: Darstellung der Veränderung des Gehaltes der Hornschicht an freien Aminosäuren nach UV-Bestrahlung mit Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeiten aus dem T-Test nach Student

Angaben in nmol/cm² Hautoberfläche ▨ = bestrahlt □ = unbestrahlt



Fortsetzung Abbildung 1:

nmol/cm² Hautoberfläche



In einem zweiten Rechengang wurden die Aminosäuren jeder einzelnen Probe in Mol% ausgedrückt, das heißt, die Summe der freien AS, sowohl der bestrahlten wie der unbestrahlten Hautstelle wurde gleich 100 gesetzt und der Aminosäuregehalt in Teilen von Hundert angegeben.

(Mol% = Mol/100 Mole Summe AS+NH₃)

Dadurch erhält man relative Mittelwerte, die einen Vergleich der Aminosäurerelationen ohne Berücksichtigung des tatsächlichen Menge/Masse Verhältnisses in der Hornschicht zwischen den Werten der bestrahlten und unbestrahlten Stellen ermöglichen. Auch hier wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten mit dem T-Test berechnet. Dabei gilt: Je geringer die Irrtumswahrscheinlichkeit ist (kleiner P-Wert), desto signifikanter ist der Unterschied der untersuchten Mittelwerte. Die Werte von Harnstoff und UCS wurden ebenfalls auf die Summe der freien AS + NH₃ = 100 bezogen.

Durch Division der relativen Mittelwerte der bestrahlten Stellen durch die relativen Mittelwerte der unbestrahlten Stellen wurden für alle Substanzen Verhältnisse gebildet. Es fiel auf, daß diese Verhältnisse teilweise sehr ähnlich waren. Dementsprechend konnten die AS in vier Gruppen aufgeteilt werden. Für Harnstoff, Thr, Ser, Gln, Ala, Tyr und Ammoniak war das Verhältnis um 1, das heißt, zwischen bestrahlten und unbestrahlten Stellen ergaben sich für diese Substanzen keine Unterschiede, was auch durch einen großen P-Wert zum Ausdruck kam.

Bei UCS, Asp, Pro, Gly, Val und Ile errechnete sich für das

Verhältnis "bestrahlt" zu "unbestrahlt" ungefähr 1,20, was einer Zunahme dieser AS in der bestrahlten Hornschicht um ca. 20% entspricht.

Die relativen Konzentrationen der Aminosäuren Cit, Glu, His und Arg nahmen um 20 - 40% ab. (Verhältnis 0,6 - 0,8)

Mit einer Zunahme von ca. 30 - 50% (Verhältnis 1,3 - 1,5) wurden die Aminosäuren Leu, Orn, Trp, Amin, Phe und Lys zusammengefaßt.

Met wurde mit einer Zunahme um 90% ebenso dieser Gruppe zugeordnet, wie Asn, für das sich nur eine geringe Signifikanz ergab. (P-Wert 0,215)

In der Tabelle finden sich die errechneten Werte des Gehalts der Hornschicht an freien AS, Harnstoff, UCS und Ammoniak, angegeben in Mol% (=Mol/100 Mole Summe AS+NH₃), mit und ohne UV-Bestrahlung. (relative Mittelwerte) Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird durch den P-Wert aus dem T-Test angegeben.

Die für Harnstoff und UCS angegebenen Mol% beziehen sich auf die Summe freier AS+NH₃ = 100.

	Relative Mittelwerte angegeben in Mol%		Verhältnis "bestrahlt"/ "unbestrahlt"	P-Wert
	bestrahlt	unbestrahlt		
Harnstoff	2,52	2,51	1,000	0,980
Thr	5,61	5,81	0,965	0,197
Ser	24,82	24,24	1,023	0,482
Gln	0,24	0,22	1,090	0,800
Ala	8,53	8,67	0,983	0,679
Tyr	1,83	1,81	1,010	0,905
Ammoniak	5,28	5,96	0,885	0,401
UCS	4,93	4,09	1,205	0,041
Asp	4,94	4,10	1,204	0,008
Pro	2,19	1,80	1,210	0,035
Gly	14,09	12,98	1,085	0,004
Val	3, 05	2,56	1,190	0,000
Ile	1,82	1,50	1,213	0,000
Glu	2,21	2,72	0,812	0,019
Cit	6,36	7,97	0,797	0,001
His	4,41	7,00	0,630	0,000
Arg	1,38	3,24	0,564	0,000
Asn	1,66	1,05	1,580	0,215
Met	0,42	0,22	1,900	0,000
Leu	2,14	1,43	1,496	0,000

Fortsetzung der Tabelle von Seite 38

Phe	1,21	0,90	1,344	0,002
Trp	0,47	0,32	1,468	0,016
Orn	4,36	3,04	1,434	0,006
Lys	2,28	1,70	1,341	0,001
Amin	0,44	0,28	1,571	0,024
XXX	0,18	0,42	0,428	0,000
Summe	99,92	100,14		

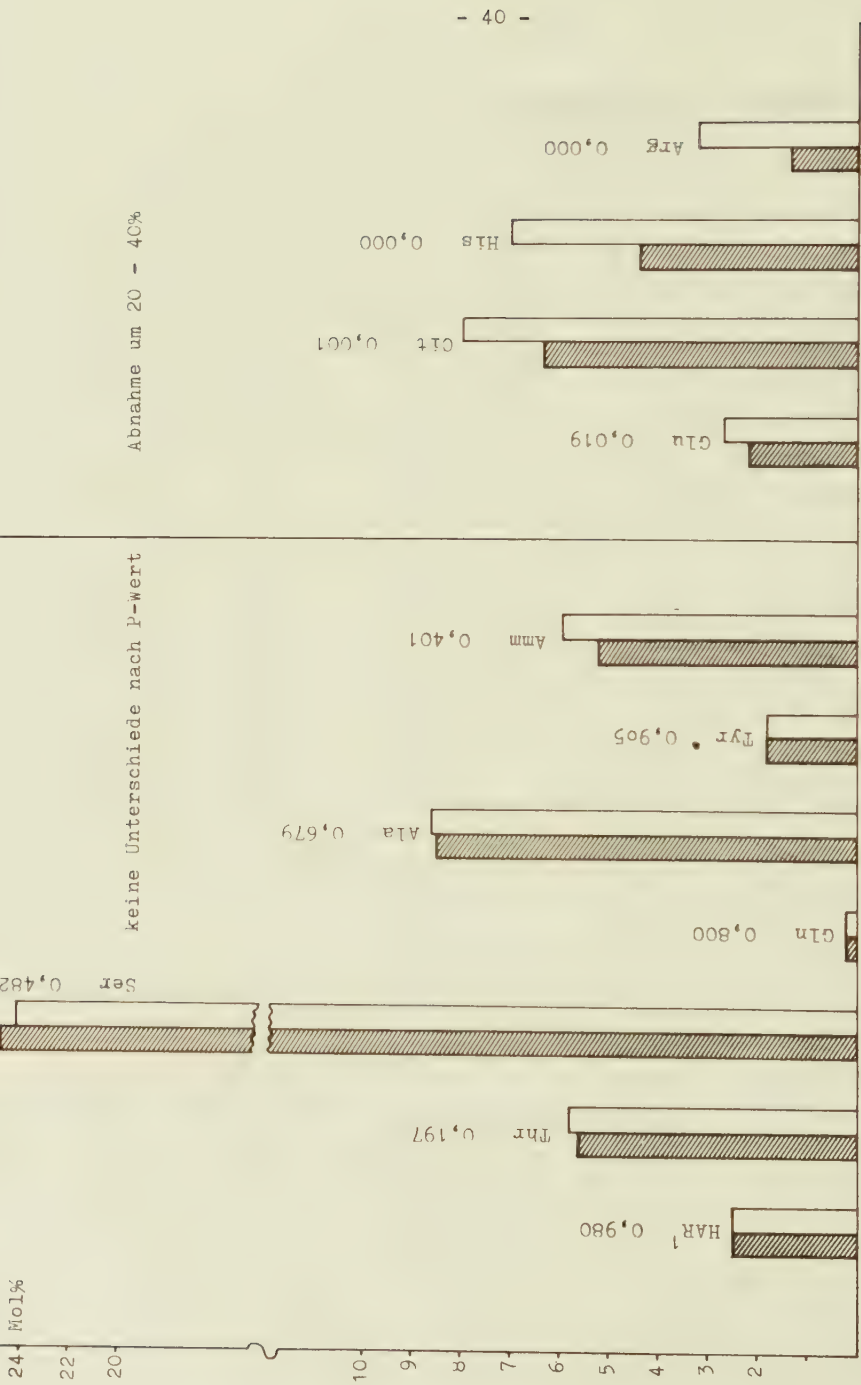
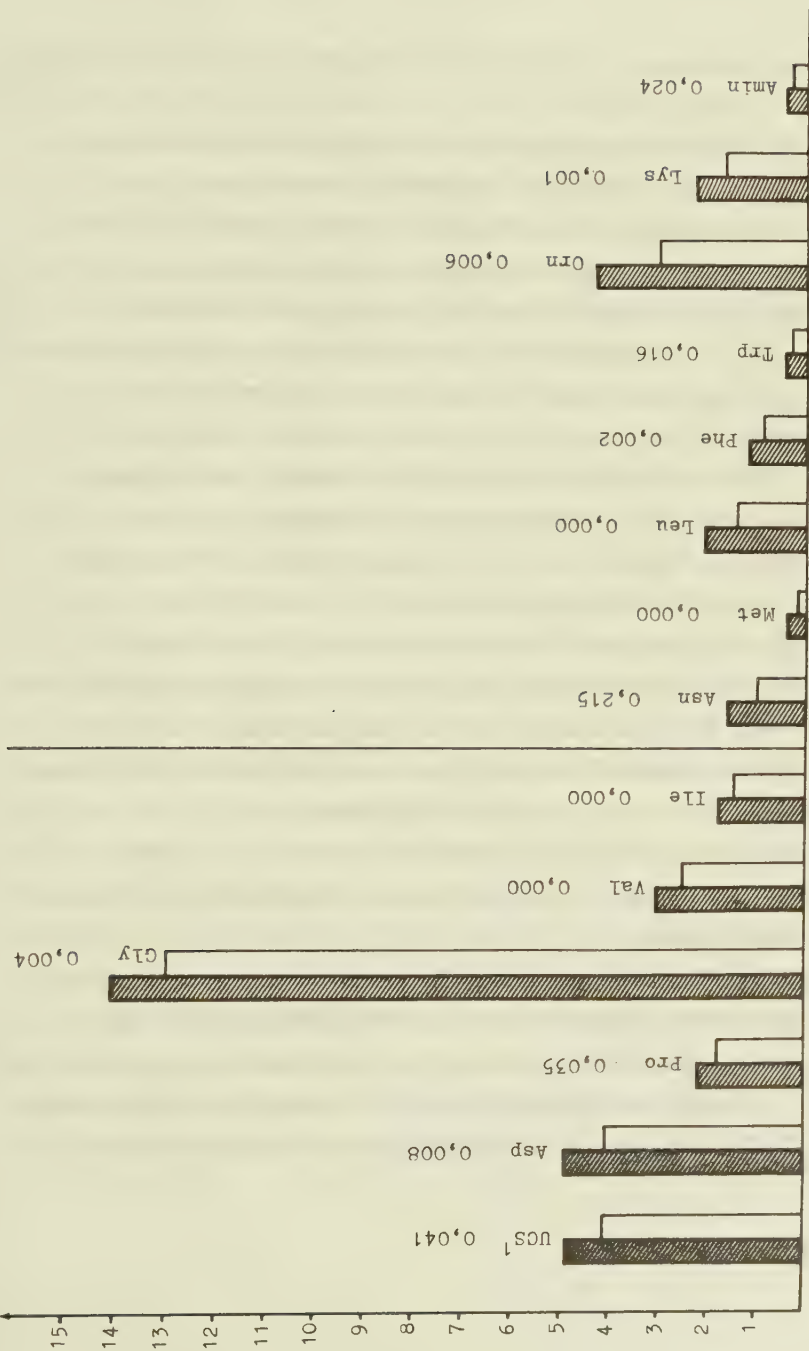


Abb. 2: Darstellung der Veränderung des Gehaltes der Hornschicht an freien Aminosäuren nach UV-Bestrahlung mit Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeiten aus dem T-Test nach Student
Angaben in Mol% = Mol/100 Mole Summe Aminosäuren + NH₂

Mol%

Zunahme um 20%

Zunahme um 30 - 50%



Fortsetzung Abbildung 2:

V. Diskussion

Die Hornschicht stellt als Endprodukt der epidermalen Regeneration die äußerste Schutzschicht des Körpers gegenüber den exogenen Einflüssen aus der Umwelt dar.

Die Hornschicht bietet sich als Untersuchungsmaterial an, wenn man die Beeinflussung des Hautorgans durch Umweltfaktoren untersuchen will, da die wasserlöslichen Bestandteile der Hornschicht als Stoffwechselprodukte des Verhornungs- und Energiestoffwechsels anzusehen sind. Sie lassen sich leicht aus der nahezu schmerzlos entfernbaren Pars disjuncta der menschlichen Hornschicht eluieren.

Einen wesentlichen Anteil am Wasserlöslichen der Hornschicht stellen die freien Aminosäuren.

In vorangegangenen Arbeiten von Müller (16) und Bader (2) wurde eine Beeinflussung der relativen Konzentrationen der freien AS durch exogene Faktoren wie Ernährung, äußerliche Wasseranwendungen als auch durch endogene Faktoren wie Alter, Haut-, Haar- und Augenfarbe nachgewiesen.

Von den Wirkungen der UV-Strahlung sind besonders die an der Haut sichtbaren wie Lichtentzündung, Hyperkeratose und "Bräunung" bekannt.

Diese sichtbaren UV-Effekte ließen eine Veränderung des epidermalen Stoffwechsels und damit Veränderungen der relativen Konzentrationen der freien AS in der Hornschicht erwarten.

In der Einleitung zu dieser Arbeit habe ich auf die durch UV-Strahlung bedingten degenerativen und karzinomatösen

Veränderungen der Haut hingewiesen. Im Hinblick auf diese bekannten UV-bedingten krankhaften Hautveränderungen kommt dem Umweltfaktor UV-Strahlung eine besondere Bedeutung zu.

In den letzten zwanzig Jahren hat die Zahl der deutschen Touristen, die in südliche, sonnenreiche Feriendörfer reisen, unaufhaltsam zugenommen. Im gleichen Tempo erfolgte die Erschließung des Hochgebirges für den Massentourismus. In fast allen öffentlichen Badeanstalten sind Solarien installiert. Viele Privathaushalte verfügen über eine sogenannte "Höhensonne".

Millionen Menschen setzen sich jedes Jahr für mehrere Wochen einer intensiven UV-Strahlung aus. Das angestrebte Ziel ist eine "Bräunung" der Haut.

Ein bedeutender Initiator dieses "Bräunungskultes" war und ist die Werbebranche. Sie verbindet mit einer braunen Hautfärbung Gesundheit, Jugend, Schönheit - Eigenschaften mit denen sich viele Menschen identifizieren wollen.

Über die Gefahren der UV-Strahlung ist die Bevölkerung aber bis heute völlig unzureichend informiert.

Es ist nicht mein Anliegen, die UV-Strahlung als in jedem Fall schädlich für den Menschen darzustellen. Wie schon erwähnt ist der therapeutische Nutzen der UV-Strahlung bei Krankheiten wie Rachitis, Tuberkulose, Psoriasis vulgaris, Akne und anderen Hautkrankheiten bekannt. Ebenso sind Reizwirkungen auf den Gesamtorganismus, das vegetative Nervensystem und die Psyche anzunehmen. Die therapeutische UV-Bestrahlung ist jedoch von der kosmetischen zu trennen. Ein kritischerer

Umgang mit dem, in unseren Breiten dosierbaren, Umweltfaktor UV-Strahlung wäre, im Hinblick auf die Gesundheit der Betroffenen, wünschenswert.

Was versteht man nun in der Wissenschaft unter "Bräunung" und wie kommt diese zustande?

Die folgenden Darstellungen stützen sich auf das Kapitel "Pigmente" und "Photochemie der Haut" aus dem Buch "Biochemie der Haut". (10)

Die Bräunung der Haut wird durch den braunschwarzen Farbstoff Melanin hervorgerufen. Das Melanin wird in den Melanozyten der Basalschicht gebildet und von diesen in sogenannten Melanosomen auf Keratinocyten des Str. germinativum übertragen. Auf diesem Wege gelangen die Melanosomen in alle Schichten der Epidermis und bedingen die Braunfärbung der Haut.

Melanin ist kein einheitlicher Körper sondern eine Stoffklasse, die aus mehreren Polymerisationsprodukten des Tyrosin-Umwandlungsproduktes Indolchinon besteht. Die Aminosäure Tyrosin, die Ausgangssubstanz des Melanins, wird durch die Einwirkung des Enzyms Tyrosinase und weitere zum Teil spontane Reaktionen zum Indolchinon umgewandelt. Die Tyrosinase liegt in den Melanosomen teilweise in inaktiver Form vor und kann durch UV-Strahlen aktiviert werden. Diese Aktivierung der Tyrosinase durch UV-Strahlen ist wahrscheinlich auf die Zerstörung von Tyrosinasehemmern zurückzuführen. Ein solcher Hemmstoff sind zum Beispiel die Thiole, deren Sulfhydrylgruppen das in der Tyrosinase enthaltene Kupfer an sich binden

und dadurch das Ferment inaktivieren.

Diese Beeinflussung der Tyrosinaseaktivität stellt den peripheren Steuermechanismus der Hautpigmentierung dar. Als zentraler Steuermechanismus sind die Hypophysenhormone MSH (Melanocyten stimulierendes Hormon) und ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) bekannt, deren Ausschüttung durch entsprechende "Releasingfaktoren" des Zwischenhirns bedingt ist. MSH und ACTH stimulieren die Melaninproduktion in den Melanocyten.

Abhängig von der Wellenlänge des UV-Lichtes unterscheiden wir heute zwei Formen der Hautreaktion auf ultraviolettes Licht.

Unter der sogenannten "direkten Pigmentierung" verstehen wir die, durch die Oxydation von bereits vorgebildetem, farblosem Propigment sofort beobachtbare Dunkelung der Haut. Sie wird besonders durch UV-Licht mit einer Wellenlänge > 315 nm, was dem UV-A Bereich entspricht, ausgelöst. Das UV-A Licht vermag bis zu den Basalzellen der Epidermis vorzudringen.

Die "indirekte Pigmentierung" wird durch UV-Licht mit Wellenlängen < 315 nm ausgelöst. Sie stellt die Melaninneubildung als Folgeprozeß der, durch das kurzwellige UV-Licht ausgelösten, Lichtentzündung dar. Durch das UV-B werden die Zellen des Stratum spinosum geschädigt, durch das UV-C findet ein Kera-
tinabbau im Stratum corneum statt.

Die indirekte Pigmentierung beruht sicher nicht auf einer

photochemischen Primärreaktion, sondern muß als Produkt des durch die Lichtschädigung veränderten Zellchemismus aufgefaßt werden. Zumal sie auch als Folge einer mechanischen oder Wärmeschädigung der Epidermiszellen beobachtet wird.

Worin liegt die Bedeutung der Hautpigmentierung durch Melanin?

Es absorbiert sowohl sichtbares wie infrarotes Licht und stellt vor allem beim Neger einen ausgezeichneten Wärmeschutz dar.

Melanin hemmt alle photochemischen Reaktionen in der Epidermis. Neben der physikalischen Absorption sind vor allem die adsorbierenden Eigenschaften des Melanins und sein Verhalten als Ionenaustauscher, wodurch photochemisch entstandene Substanzen unschädlich gemacht werden, von Bedeutung.

Das Ziel der UV-Bestrahlungen war eine intensive Braunfärbung der Haut am ganzen Körper. Auch war wohl für die meist weiblichen Versuchspersonen die Ankündigung, "Sommerbräune" schon im Frühjahr zu erlangen, der ausschlaggebende Anreiz an den Versuchen teilzunehmen. Da mir aus der Literatur bekannt war, daß vor allem das UV-A Licht für eine schnelle und intensive Pigmentierung maßgeblich ist, suchten wir nach einer geeigneten UV-A Lichtquelle. Diese glaubten wir in dem "Solarium de Luxe" der Fa. Hanau gefunden zu haben. Die Herstellerfirma weist in ihrem Werbeprospekt auf den relativ hohen UV-A Anteil ihres Ultraviolett-Hochleistungsbrenners im Gegensatz zu herkömmlichen "Höhensonnen" hin. Die gefähr-

lichen UV-C Strahlen sollen aus dem UV-Licht des Solariums weitgehend eliminiert sein.

Eine Bestimmung der Spektrallinien für das "Solarium de Luxe" erfolgte durch Herrn Dr. Kleinschmidt vom Institut für medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München. Er fand keine Spektrallinien im UV-C Bereich, fünf Linien im UV-B Bereich nämlich bei 280 nm, 290 nm, 296 nm, 305 nm und 312 nm und drei Linien im UV-A Bereich bei 335 nm, 365 nm und 405 nm.

Zum Vergleich wurde mit derselben Meßanlage ein Sonnenspektrum bei extremem Schönwetter aufgezeichnet. Hier ergab sich ein kontinuierliches Spektralbild, das bei einer Wellenlänge von 305 nm als kurzwelliger Grenze begann und sämtliche Wellenlängen im UV-A Bereich beinhaltet. Wellenlängen unter 295 nm werden bekanntlich von der Ozonschicht der Atmosphäre absorbiert und erreichen die Erdoberfläche nicht.

Die UV-A Dosis eines künstlichen UV-Strahlers aus einem Solarium beträgt zwischen 4 und 8 Watt/m² bei dem vorgeschriebenen Bestrahlungsabstand. Im Vergleich dazu beträgt die UV-A Dosis der Sonne zwischen 60 und 70 Watt/m² bei extremem Schönwetter in unseren Breiten und bei ca. 500 m Seehöhe. Diese Angaben stützen sich auf die persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Kleinschmidt.

Die Werbung des Herstellers "Wie die Sonne selbst, gibt das Solarium Ultraviolettstrahlen ab. Die UV-Strahlung fördert den Stoffwechsel und die Funktion des gesamten Organismus,

pflegt, strafft und bräunt die Haut - schenkt Gesundheit, die man sieht." " Das UV-A Licht dringt in die Haut ein, dunkelt die Hautpigmente intensiv und schenkt so das begehrte Urlaubsbraun.", der sein Solarium mit der Sonne vergleicht ist also sowohl was das Spektralbild der UV-Strahlung betrifft, als auch in Bezug auf die Dosis der UV-A Strahlung nicht zutreffend. Die degenerativen Prozesse, die in der Haut durch UV-Strahlen hervorgerufen werden, stehen in deutlichem Gegensatz zur Werbung, nach deren Aussage die UV-Strahlen die Haut pflegen, straffen und ihr Gesundheit schenken.

Die Spektrallinien des Solariums im UV-B Bereich bedingen eine, im Vergleich zur Sonnenbestrahlung frühzeitig einsetzende Lichtentzündung. Bei meinen Versuchen beobachtete ich je nach Hauttyp ein leichtes Erythem schon nach Bestrahlungszeiten von 5 bis 10 Minuten und einem Bestrahlungsabstand von 1,20 m. Auf die relativ niedrigen UV-A Dosen führe ich zurück, daß ich in keinem Fall eine "direkte Pigmentierung" während der durchschnittlich acht Bestrahlungen vor Erreichen der Erythemschwelle beobachtet habe. Von Bedeutung ist auch, daß das Solarium nur einzelne Linien im UV-A Spektrum enthält, während die Sonne ein kontinuierliches Spektrum aufweist.

Nach dem Erreichen der Erythemschwelle löste ich bei allen Versuchspersonen durch eine kontinuierlich gesteigerte UV-Bestrahlung an ca. 10 darauffolgenden Tagen neue Erytheme aus. Trotz der wiederholten Erythemauslösung beobachtete

ich in vielen Fällen nur eine mittelstarke, in einigen wenigen Fällen nur eine schwache Bräunung. Die mehrmals durch die Lichtentzündung angeregte "sekundäre Pigmentierung" erreichte bei keiner Versuchsperson eine der "Sommerbräune" vergleichbare Pigmentierung. Dieser Befund spricht für die Bedeutung der "direkten Pigmentierung", die durch im Sonnenlicht reichlich vorhandene UV-A Strahlen ausgelöst wird. Durch die unterschiedliche Empfindlichkeit der Versuchspersonen gegenüber den UV-Strahlen mußte ich für jede Versuchsperson ein individuelles Bestrahlungsprogramm finden. Die Folge war eine in der Intensität sehr unterschiedliche Bestrahlung zwischen den verschiedenen Versuchspersonen. Diese Intensitätsunterschiede in der Bestrahlung kommen als mögliche Fehler bei den Ergebnissen in Frage.

An exogenen Faktoren, die einen Einfluß auf den Gehalt der Hornschicht an freien Aminosäuren haben, wurden schon die Ernährung, Badegewohnheiten und die Neigung zu starkem Schwitzen als Beispiele genannt. Mögliche Fehler durch den Faktor Ernährung konnten wahrscheinlich durch das gemeinsame Kantinenessen von 14 der 18 Versuchspersonen gering gehalten werden. Auf die sicher sehr unterschiedlichen Badegewohnheiten der Versuchspersonen konnte ich nur einen sehr geringen Einfluß ausüben, indem ich die Versuchspersonen bat, sich jeweils am Tag vor dem Hornschichtabriß und am Abrißtag selbst nicht mehr zu duschen oder zu baden. Die bereits genannten endogenen Faktoren, die den Gehalt der Hornschicht an freien Aminosäuren beeinflussen wie Al-

ter, Haut-, Haar- und Augenfarbe sollen hier noch einmal erwähnt werden.

Da 16 der 18 Versuchspersonen zwischen 18 und 25 Jahren alt waren dürften die Fehlermöglichkeiten, bedingt durch einen Altersunterschied, gering sein.

Haut- oder Stoffwechselkrankheiten die den Gehalt an freien Aminosäuren in der Hornschicht beeinflussen lagen bei keiner Versuchsperson vor.

Die Wahl des Gesäßes als Abrißstelle für die Hornschichtproben erfolgte aus der Überlegung, daß die genannten exogenen und endogenen Faktoren auf beide Gesäßhälften nahezu gleich intensiv einwirken. Veränderungen der relativen Konzentrationen der freien Aminosäuren zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gesäßhälfte werden so als UV-bedingte Veränderungen wahrscheinlich gemacht. Üblicherweise ist die Gesäßhaut der UV-Strahlung nie und dem Wasser vergleichsweise selten ausgesetzt. Für die UV-Genese der beobachteten Veränderungen spricht auch ihr Ausmaß. Nach Müller (16) weichen die relativen molaren Konzentrationen von zwei Hornschichtproben der gleichen Versuchsperson, ohne eine spezielle Therapie, nur bis maximal 10% vom Mittelwert ab; d.h. es existiert im Aminosäuremuster der Hornschicht einer Person eine gewisse Konstanz.

Bei der Materialgewinnung stellte sich die Frage, bis zu welcher Tiefe die Hornschicht abgetragen werden sollte. Da das Entfernen der Hornschicht bis zur Barriere schmerzlos

ist und nach Angaben von Spier (26) der Aminosäuregehalt der Hornschicht keine Änderung je nach Schichttiefe erfährt, entschied ich mich für die Abtragung der Hornschicht bis zur Barriere. Um die Hornschicht bis zur Barriere abzureißen benötigte ich bei den verschiedenen Versuchspersonen zwischen sieben und vierzehn Abrißen auf der unbestrahlten Gesäßhälfte. Diese starken Unterschiede erklären sich durch eine individuell recht beträchtlich schwankende Hornschichtdicke, den Fettgehalt und die Schweißabsonderung der Haut, die den Klebstoff auf dem Tesafilm^R abstoßen. Die durchweg höhere Abrißzahl auf der bestrahlten Gesäßseite ist durch die aktinische Hyperkeratose erklärt.

Die Hornschicht ließ sich mit Tesafilm^R Klebestreifen nicht in völlig gleichmäßigen Schichten abtragen, was daran zu erkennen war, daß die Barriere nur an einzelnen Punkten der Haut sichtbar wurde.

Auch konnte die markierte Hautstelle nicht immer exakt eingehalten werden, was ein Mitreißen oberflächlicher Hornschichtlagen vom Rand her bedeutete. Diese Ungenauigkeiten dürfen aber bei der angenommenen Konstanz der Aminosäurekonzentrationen in den verschiedenen Lagen der Hornschicht vernachlässigt werden.

Das Zerschneiden der Tesafilmstreifen (pro Gesäßhälfte durchschnittlich 10 Stück von je 15 cm Länge) in ca. 1 cm lange Schnipsel und das Einbringen der Schnipsel in Zentrifugengläser war wegen der Klebeeigenschaften

des Tesafilms sehr mühsam.

Die sofortige Aufarbeitung der Hornschichtproben durch Elution in 0,1 normaler Salzsäurelösung und Tiefgefrieren des Eluates bei -18°C ist wegen der möglichen Zersetzung der Aminosäuren durch Bakterien von Bedeutung.

Es war zu erwarten, daß mit einer durch die UV-Bestrahlung ausgelösten vermehrten Keratinisierung auch der Bestand der im Keratin enthaltenen freien Aminosäuren pro Flächeneinheit zunimmt.

Die Zunahme der molaren Mittelwerte der freien Aminosäuren pro Quadratcentimeter (nmol/cm^2) an der bestrahlten Hautstelle bestätigt diese Erwartung und erklärt sich durch die größere Menge an abgerissener Hornsubstanz.

Wenn dabei, wie aus den Ergebnissen hervorgeht, diese Zunahme nicht für alle Verbindungen in gleichem Maße stattfindet, müssen mehrere verschiedene biochemische Faktoren an der Entstehung der freien Aminosäuren in der menschlichen Hornschicht beteiligt sein, wobei diese Faktoren in unterschiedlichem Maße durch eine UV-Bestrahlung angestoßen werden.

Der Vergleich von relativen molaren Konzentrationen, ausgedrückt in $\text{Mol}/100$ Mole Summe Aminosäuren + NH_3 , ermöglicht es, die durch UV-Bestrahlung veränderte Zusammensetzung der freien Aminosäuren zu erkennen.

Auffällig ist eine Abnahme des Histidins um 20% bei gleich-

zeitiger Entstehung von Urocaninsäure. Diese Reaktion, durch das Enzym Histidin - Ammoniaklyase katalysiert, wird hier durch UV-Strahlung stimuliert.

Auch die relative Abnahme von Arginin und entsprechende Zunahme von Ornithin kann durch eine Arginaseaktivierung im Harnstoffzyklus erklärt werden. Unklar bleibt dabei der Befund, daß der Harnstoffwert nicht entsprechend ansteigt. An einen Abbau durch Enzyme von Mikroorganismen ist zu denken.

Mit Ausnahme dieser beiden Reaktionen ist die Erklärung der Ergebnisse durch Annahme einer Vielzahl von verschiedenen Primärreaktionen zwischen freien Aminosäuren und der UV-Strahlung äußerst zweifelhaft.

Die Ausbeuten bei Primärreaktionen an freien Aminosäuren sind mit den vorkommenden Strahlenintensitäten so gering, daß eine Veränderung der relativen Konzentrationen der Aminosäuren in dem beobachteten, ausgedehnten Maße auf diesem Wege sehr unwahrscheinlich ist.

Eine Zuordnung der sich abzeichnenden vier Stoffgruppen zu bestimmten Reaktionen im Stoffwechsel erscheint schwierig. Das Gruppenverhalten legt die Annahme nahe, daß lösliche Proteine bzw. Peptide, in denen jeweils die Aminosäuren einer Gruppe prävalieren, durch ihre verstärkte Auflösung oder Persistenz diese Veränderungen bewirken. Dabei ist sowohl ein direkter Angriff der UV-Strahlung am Protein, als auch eine indirekte Beeinflussung durch Aktivierung bzw. Hemmung von proteolytischen und synthetischen

Enzymen durch UV-Strahlung denkbar.

Durch die Aktivierung des Proteinabbaues würde eine relative Vermehrung der das Protein aufbauenden Aminosäuren bedingt sein. Die Retardierung einer Aminosäuregruppe wäre entsprechend durch eine Hemmung des Proteinabbaues oder eine Aktivierung der Proteinsynthese zu erklären.

An die Hemmung photochemischer Reaktionen durch das Pigment Melanin soll hier nochmals erinnert werden.

Die Bedeutung löslicher Proteine bei der Keratinisation ist zwar bekannt, aber die Zusammenhänge sind noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt.

Schwarz (25) weist auf die essentielle Bedeutung eines Histidin-Proteins (HP) bei der Biogenese des Keratohyalins hin.

Leonhardi (13) fand 3 epidermisspezifische Nucleoproteine, die ebenfalls mit dem Verhornungsprozeß verknüpft sind.

Auch die, durch viele Untersucher immer wieder gefundene Konstanz der relativen molaren Konzentrationen der freien Aminosäuren, von der durch endogene und exogene Faktoren bedingten Variationsbreite einmal abgesehen, legt die Auflösung von Proteinen, unmittelbar vor der endgültigen Verhornung, als ihren Entstehungsmechanismus nahe.

Die Aufklärung des Aminosäuregehalts dieser löslichen Proteine würde vermutlich eine Deutung der gefundenen UV-Wirkung zulassen und damit eine Zuordnung zwischen den hier gefundenen 4 Reaktionsgruppen und bestimmten Proteinen ermöglichen.

VI. Zusammenfassung

Die in der Hornschicht vorliegenden freien Aminosäuren sind Produkte des Energie- und Verhornungsstoffwechsels der Epidermis. Sowohl endogene wie exogene Faktoren haben einen Einfluß auf diese Stoffwechselvorgänge in der Epidermis. Eine Reihe von Faktoren wurden in vorausgehenden Arbeiten untersucht.

Meine Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Umweltfaktor UV-Strahlung auf die menschliche Epidermis und ihren Auswirkungen auf die freien Aminosäuren in der Hornschicht. Dazu wurden 18 "hautgesunde" Versuchspersonen mit einem "Solarium de Luxe" der Fa. Hanau als UV-Strahlungsquelle am ganzen Körper bestrahlt.

Um Vergleiche zwischen bestrahlten und unbestrahlten Hautbezirken anstellen zu können, deckte ich jeweils eine Gesäßhälfte mit Aluminiumfolie ab.

Zur Gewinnung des Str. disjunctum der Hornschicht führte ich ca. 1 Woche nach Bestrahlungsende auf beiden Gesäßhälften Hautabrisse mit Tesafilm^R durch.

Durch Elution in 0,1N HCl extrahierte ich aus den Tesafilmabrisse das Wasserlösliche und identifizierte die freien Aminosäuren nach ihrer Auftrennung durch Flüssigkeits-Säulenchromatographie.

Neben 22 identifizierbaren Aminosäuren wurden noch Ammoniak und ein nicht identifizierbarer Peak gefunden. Zusätzlich wurden Harnstoff und Urocaninsäure im Eluat bestimmt.

Außer bei Arginin und der nicht identifizierten Substanz, war bei allen anderen Substanzen eine signifikante Mengenzunahme der freien Aminosäuren pro Quadratcentimeter Hornschicht durch die Bestrahlung zu beobachten, was sich durch die größere Menge an abgeriebenem Hornschichtmaterial auf der bestrahlten Seite erklärt.

Aus den relativen Mittelwerten, ausgedrückt in Mol%, ergaben sich 4 Gruppen von Aminosäuren, die sich durch ein annähernd gleiches Verhalten in Bezug auf das Verhältnis "bestrahlt : unbestrahlt" auszeichneten.

1. Keine Unterschiede in den relativen Mengen bestanden bei den Aminosäuren Thr, Ser, Gln, Ala, Tyr sowie Harnstoff und Ammoniak.
2. Eine Zunahme auf der bestrahlten Seite um 20% ergab sich für UCS, Asp, Pro, Gly, Val und Ile.
3. Eine Zunahme um 30 - 50% für Leu, Orn, Trp, Amin, Phe und Lys.
4. Eine Abnahme um 20 - 40% auf der bestrahlten Seite für Cit, Glu, His und Arg.

Dieses Gruppenverhalten setzt unterschiedliche biochemische Reaktionen voraus, die sich im Laufe der Keratinisierung der Epidermis an noch nicht identifizierten Proteinen abspielen. Auch an bakterielle Einflüsse ist zu denken.

VII. Literaturverzeichnis

1. Baden, H.P.: A comparative study of the physico-chemical properties of human keratinized tissues
Biochemica et Biophysica Acta 322, 269-278 (1973)
2. Bader, G.: Untersuchungen über die freien Aminosäuren der menschlichen Hornschicht im Verlaufe einer Hydrotherapie
Dissertation München 1975
3. Beetz, H.M.: Zur Tiefenverteilung der Hautbakterien im Stratum corneum
Vortrag am Dermatologischen Kongreß 1971
4. Braun Falco, O.: Dermatologie und Venerologie
Lehmanns Verlag München 1969
5. Bullough, W.S.: The rejuvenation of the skin
J. Soc. Cosm. Chem. 21, 503-520 (1971)
6. Christophers, E.: Epidermale Regeneration: Zellkinetische Aspekte
Vortrag am Dermatologischen Kongreß 1971
7. De Bersaques, J.; Rothman, S.: Mechanism of keratin formation
Proc. 12. int. Congr. Derm. 2, 1279 (1962)

8. Ferreira-Marques, J.: Beitrag zur Kenntnis der Biologie
der Epidermis Stratum oxybioticum und
Stratum anoxybioticum
Rev. argent. Derm. 44,87 (1960)
9. Grüneberg, T., Szakall, A.: Über den Gehalt an Schwefel
und wasserlöslichen Bestandteilen in
der verhornten Epidermis
Arch. klin. exp. Derm. 201,361 (1955)
10. Herrmann, F., Ippen, H., Schaefer, H., Stüttgen, G.: Biochemie
der Haut
Thieme Verlag Stuttgart (1973)
11. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme Verlag Stuttgart (1972)
12. Leonhardi, G., Löhner, L., Grünecci, J., Schmidt, I.: Auftrennung
wasserlöslicher epidermaler Proteine
mittels Disc-Elektrophorese
Arch.klin.exp.Derm. 234,61-69 (1969)
13. Leonhardi, G., Löhner, L., Grünecci, J.: Untersuchungen zur
Charakterisierung der löslichen epi-
dermalen Proteine
Arch.klin.exp.Derm. 237,662-674 (1970)
14. Leonhardt, H.: Histologie und Zytologie des Menschen
Thieme Verlag Stuttgart 1971

15. Miescher, G.: Über die antibakterielle Wirkung an
der Hautoberfläche
Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.(1959)
16. Müller, W.: Aminosäurekonzentrationen in der Horn-
schicht und deren Beziehungen zu exo-
genen und endogenen Faktoren
Dissertation München 1973
17. Niebauer, G.: Keratinosomen
Vortrag am Dermatologischen Kongreß
1971
18. Pinkus, H.: Morphokinetik der Epidermis
Vortrag am Dermatologischen Kongreß
1971
19. Pratzel, H.: Der Stoffwechsel der Haut als Teil
des Gesamtstoffwechsels
Arch.f.Physikal.Therapie 333-348
(1968)
20. Pratzel, H.: Biochemische Vorgänge in der mensch-
lichen Hautoberfläche
Dissertation TH München (1970)
21. Schwarz, E.: Zur Biochemie der Epidermis
Vortrag am Dermatologischen Kongreß
1971

22. Schwarz, E.: Wasserlösliches
Arch.klin.exp.Derm. 227,191 (1966)
23. Schwarz, E.: Freie Aminosäuren und Harnstoff in
psoriatischen und normalen epiderma-
len Verhornungsprodukten
Arch.klin.exp.Derm. 225,299-305
(1966)
24. Schwarz,E., Kloss,G.: Freie Aminosäuren und andere
Ninhydrinpositive Substanzen in nor-
maler Hornschicht u. in Psoriasis-
schuppen
Arch.klin.exp.Derm. 228,188-198 (1967)
25. Schwarz, E.: Zur Frage der Histidin-Conversion zu
Urocaninsäure in der Epidermis
Arch.klin.exp.Derm. 237,675-683 (1970)
26. Spier, H.W.: Symposium I, Physiologie der epiderma-
len Verhornung
Arch.klin.exp.Derm. 219-568 (1964)
27. Spier, H.W.,Pascher,G.: Die wasserlöslichen Bestand-
teile d. peripheren Hornschicht.
Quantitative Analyse. VI. Urocaninsäure
Arch.klin.exp.Derm. 209,181-193 (1959)

28. Spier, H.W., Pascher, G.: Physiologie der Hautoberfläche
Act. Probl.Derm. 1, 1-46 (1959)
29. Stüttgen, G.: Die normale und pathologische Physiologie der Haut
Gustav Fischer Verlag Jena (1965)
30. Stüttgen, G., Schaefer, H.: Funktionelle Dermatologie
Springer Verlag Berlin Heidelberg
New York 1974
31. Szakall, A.: Über die Eigenschaften, Herkunft und physiologische Funktion durch die H^+ -Ionenkonzentration bestimmenden Wirkstoffe in der verhornten Epidermis
Arch.klin.exp.Derm. 201, 331ff (1955)

Herrn Diplom-Chemiker Dr. rer. nat. H. Pratzel möchte ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. H. Drexel danke ich für die Übernahme des Themas und die Anregungen zur Ausarbeitung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München für ihre immer bereitwillige Hilfe.

Frau Karla Tilemann-Frantz danke ich für die Zeichnung der Abbildungen sowie den vielen nicht genannten Versuchspersonen für ihre Teilnahme.

Meiner Frau Helga danke ich für die Schreibarbeiten.

Lebenslauf

Am 14.3.1951 wurde ich, Peter Fries, als Sohn des Studienprofessors Rüdiger Fries und seiner Frau Meta, geb. Schott, in München geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in München, von 1961 bis 1970 das Erasmus-Grasser-Gymnasium, wo ich 1970 das Abitur ablegte.

Von 1971 bis 1977 studierte ich Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München, wo ich am 24.6.1977 die ärztliche Prüfung ablegte.

Seit September 1977 arbeite ich im Kreiskrankenhaus München-Pasing als Medizinalassistent.

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

